

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

14. 9. 2004

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application: 2003年 9月11日

出 願 番 号
Application Number: 特願2003-319538
[ST. 10/C]: [JP2003-319538]

REC'D 04 NOV 2004

WIPO PCT

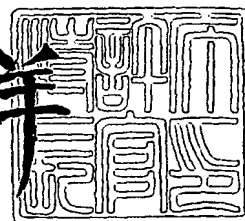
出 願 人
Applicant(s): ヒュービット ジェノミクス株式会社
土井 俊夫

**PRIORITY
DOCUMENT**
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2004年10月21日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

小 川 洋



BEST AVAILABLE COPY

【書類名】 特許願
【整理番号】 P03-045
【提出日】 平成15年 9月11日
【あて先】 特許庁長官 殿
【国際特許分類】 A01K
G01N

【発明者】
【住所又は居所】 京都府京都市上京区油小路通元誓願寺下ル東入戒光寺町 4 9 5 -
1 - 1 0 2
【氏名】 土井 俊夫

【発明者】
【住所又は居所】 徳島県徳島市出来島本町 4 - 9 サーパス出来島 6 0 3 号
【氏名】 安部 秀斉

【特許出願人】
【識別番号】 501124337
【氏名又は名称】 ヒュービットジェノミクス株式会社
【代表者】 一圓 剛

【特許出願人】
【住所又は居所】 京都府京都市上京区油小路通元誓願寺下ル東入戒光寺町 4 9 5 -
1 - 1 0 2
【氏名又は名称】 土井 俊夫

【代理人】
【識別番号】 100098121
【弁理士】
【氏名又は名称】 間山 世津子

【選任した代理人】
【識別番号】 100107870
【弁理士】
【氏名又は名称】 野村 健一

【手数料の表示】
【予納台帳番号】 093194
【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】
【物件名】 特許請求の範囲 1
【物件名】 明細書 1
【物件名】 図面 1
【物件名】 要約書 1

【書類名】 特許請求の範囲**【請求項 1】**

生体試料におけるSmad1及び／又はSmad1活性化作用を有する物質の発現を測定することを含む、糖尿病性腎症の検出方法。

【請求項 2】

生体試料におけるSmad1及び／又はSmad1活性化作用を有する物質の発現を測定することを含む、糖尿病性腎症の進行度及び／又は治療の有効性を評価する方法。

【請求項 3】

Smad1及び／又はSmad1活性化作用を有する物質の発現を測定するための試薬を含む、糖尿病性腎症を検出するためのキット。

【請求項 4】

Smad1及び／又はSmad1活性化作用を有する物質の発現を測定するための試薬を含む、糖尿病性腎症の進行度及び／又は治療の有効性を評価するためのキット。

【請求項 5】

Smad1の発現を抑制する作用を有する物質を有効成分として含む、糖尿病性腎症の予防及び／又は治療剤。

【請求項 6】

Smad1の発現を抑制する作用を有する物質を有効成分として含む、細胞外マトリックスの増殖を阻害する薬剤。

【請求項 7】

Smad1の発現を抑制する作用を有する物質を有効成分として含む、 $\alpha 1$ IV型コラーゲンの発現を抑制する薬剤。

【請求項 8】

被験物質がSmad1の発現を抑制するか否かを判定することを含む、糖尿病性腎症の予防及び／又は治療に有効な物質を同定する方法。

【請求項 9】

被験物質がSmad1の発現を抑制するか否かを判定することを含む、細胞外マトリックスの増殖阻害に有効な物質を同定する方法。

【請求項 10】

被験物質がSmad1の発現を抑制するか否かを判定することを含む、 $\alpha 1$ IV型コラーゲンの発現抑制に有効な物質を同定する方法。

【請求項 11】

Smad1の発現を測定するための試薬を含む、糖尿病性腎症の予防及び／又は治療に有効な物質を同定するためのキット。

【請求項 12】

Smad1の発現を測定するための試薬を含む、細胞外マトリックスの増殖阻害に有効な物質を同定するためのキット。

【請求項 13】

Smad1の発現を測定するための試薬を含む、 $\alpha 1$ IV型コラーゲンの発現抑制に有効な物質を同定するためのキット。

【書類名】明細書

【発明の名称】糖尿病性腎症の検出方法及びキット、糖尿病性腎症の予防及び／又は治療剤、ならびに糖尿病性腎症の予防及び／又は治療に有効な物質を同定する方法及びキット

【技術分野】

【0001】

本発明は、糖尿病性腎症の検出方法及びキット、糖尿病性腎症の予防及び／又は治療剤、ならびに糖尿病性腎症の予防及び／又は治療に有効な物質を同定する方法及びキットに関する。

【背景技術】

【0002】

$\alpha 1$ IV型コラーゲン (Col4) は、血管内皮細胞と中膜平滑筋細胞の間に存在する血管基底膜の主要な構成成分であり、Col4の過剰産生は糖尿病性血管障害、動脈硬化、老化に関連する疾患に決定的な役割を果たす。また、持続的な高血糖状態は糖尿病の合併症の主要な原因であると認識されている (非特許文献1及び2)。過剰なAdvanced glycation end products (AGEs) は高血糖によっておき、血管およびその他細胞において様々なイベントを誘導する事が知られており、おそらく数種類のAGEsレセプターを通じて病態に関わっていると考えられる (非特許文献3、4及び5)。AGEsは近年では糖尿病合併症に関わるだけではなく、老化による動脈硬化にも関連するという考えが受け入れられている (非特許文献6及び7)。さらに、切断型の可溶性のAGEsレセプターが、糖尿病性の動脈硬化の進展を抑制するという報告がある (非特許文献8)。

【0003】

糖尿病性腎症の進行は、形態学的には腎糸球体基底膜 (GBM) の肥厚およびメサンギウム基質 (ECM) の増大によって特徴付けられる。Col4は糸球体基底膜肥厚およびメサンギウム基質増大の主要な構成成分であるので、Col4が糖尿病の状態においてどのように転写制御されるかを明らかにすることは重要である。Col4の双方向性の130bpのプロモーターは、いくつかのDNA結合タンパクと反応することが知られている大きなステムループ構造 (CIV) を持つ (非特許文献9)。本発明者らは、先の報告においてゲルシフトアッセイにより、未知のタンパクがAGEsへの暴露によりCol4が誘導される場合のみにCIVに結合することを示した (非特許文献10)。

【0004】

【非特許文献1】 The Diabetes Control and Complications Trial Research Group. N. Engl. J. Med. 329, 977-986 (1993).

【非特許文献2】 UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. Lancet 352, 837-853 (1998)

【非特許文献3】 H. Vlassara, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 11704-11708 (1994).

【非特許文献4】 M. Brownlee, A. Cerami, H. Vlassara, N. Engl. J. Med. 318, 1315-1321 (1988).

【非特許文献5】 T. Doi, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 89, 2873-2877 (1992).

【非特許文献6】 H. Vlassara, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 89, 12043-12047 (1992).

【非特許文献7】 M. S. Huijberts, et al., J. Clin. Invest. 92, 1407-1411 (1993).

【非特許文献8】 S. L. Park, et al., Nature Med. 9, 1025-1031 (1998)

【非特許文献9】 L. A. Bruggeman, P. D. Burbelo, Y. Yamada, P. E. Klotman, Oncogene 7, 1497-1502 (1992).

【非特許文献10】 N. Iehara, H. Takeoka, Y. Yamada, T. Kita, T. Doi, Kidney Int. 50, 1166-1172 (1996).

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

糖尿病性腎症は末期腎不全の主な原因である。IV型コラーゲンは血管基底膜や腎糸球体メサンギウム基質の主要な構成成分であり、糖尿病における血管障害に重大な役割を果たしているが、糖尿病の状態で何がIV型コラーゲンの過剰産生に直接関わっているかは知られていない。本発明は、IV型コラーゲンの過剰産生に直接関わっている物質を同定し、その物質が糖尿病性腎症の病因として決定的な役割を持つことを示すことを目的とする。また、本発明は、IV型コラーゲンの過剰産生に直接関わっている物質を利用した糖尿病性腎症の検出方法及びキットを提供することも目的とする。さらに、本発明は、IV型コラーゲンの過剰産生に直接関わっている物質の発現を抑制する作用を有する物質の用途を提供することも目的とする。さらにまた、本発明は、糖尿病性腎症の予防及び／又は治療に有効な物質を同定する方法及びキット、細胞外マトリックスの増殖阻害に有効な物質を同定する方法及びキット、ならびに $\alpha 1$ IV型コラーゲンの発現抑制に有効な物質を同定する方法及びキットを提供することも目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0006】

本発明者らは、IV型コラーゲンの過剰産生に直接関わっている物質としてSmad1を同定し、Smad1が糖尿病性腎症の病因として決定的な役割を持つことを示した。また、本発明者らは、健常人及び糖尿病性腎症の患者の腎糸球体におけるSmad1及びアクチビン受容体様キナーゼ1 (ALK1) の発現を調べたところ、糖尿病性腎症患者におけるSmad1及びALK1の発現は硬化性病変の重症度と比例するが、健常人ではSmad1及びALK1の発現がほとんど認められなかったことも見出した。さらに、Smad1の発現を制御と特異的に反応するBMP2及び4の発現がAGEs刺激下で増加することも見出した。本発明は、これらの知見に基づいて完成されたものである。

【0007】

本発明の要旨は以下の通りである。

- [1] 生体試料におけるSmad1及び／又はSmad1活性化作用を有する物質の発現を測定することを含む、糖尿病性腎症の検出方法。
- [2] 生体試料におけるSmad1及び／又はSmad1活性化作用を有する物質の発現を測定することを含む、糖尿病性腎症の進行度及び／又は治療の有効性を評価する方法。
- [3] Smad1及び／又はSmad1活性化作用を有する物質の発現を測定するための試薬を含む、糖尿病性腎症を検出するためのキット。
- [4] Smad1及び／又はSmad1活性化作用を有する物質の発現を測定するための試薬を含む、糖尿病性腎症の進行度及び／又は治療の有効性を評価するためのキット。
- [5] Smad1の発現を抑制する作用を有する物質を有効成分として含む、糖尿病性腎症の予防及び／又は治療剤。
- [6] Smad1の発現を抑制する作用を有する物質を有効成分として含む、細胞外マトリックスの増殖を阻害する薬剤。
- [7] Smad1の発現を抑制する作用を有する物質を有効成分として含む、 $\alpha 1$ IV型コラーゲンの発現を抑制する薬剤。
- [8] 被験物質がSmad1の発現を抑制するか否かを判定することを含む、糖尿病性腎症の予防及び／又は治療に有効な物質を同定する方法。
- [9] 被験物質がSmad1の発現を抑制するか否かを判定することを含む、細胞外マトリックスの増殖阻害に有効な物質を同定する方法。
- [10] 被験物質がSmad1の発現を抑制するか否かを判定することを含む、 $\alpha 1$ IV型コラーゲンの発現抑制に有効な物質を同定する方法。
- [11] Smad1の発現を測定するための試薬を含む、糖尿病性腎症の予防及び／又は治療に有効な物質を同定するためのキット。
- [12] Smad1の発現を測定するための試薬を含む、細胞外マトリックスの増殖阻害に

有効な物質を同定するためのキット。

【13】 Smad1の発現を測定するための試薬を含む、 $\alpha 1$ IV型コラーゲンの発現抑制に有効な物質を同定するためのキット。

【発明の効果】

【0008】

本発明により、IV型コラーゲンの過剰産生に直接関わっている物質としてSmad1が同定され、Smad1が糖尿病性腎症の病因として決定的な役割を持つことが示された。これにより、糖尿病性腎症の検出が可能となり、さらに、糖尿病性腎症の予防及び／又は治療剤、細胞外マトリックスの増殖を阻害する薬剤、 $\alpha 1$ IV型コラーゲンの発現を抑制する薬剤が提供された。また、本発明により、糖尿病性腎症の予防及び／又は治療に有効な物質を同定する方法及びキット、細胞外マトリックスの増殖阻害に有効な物質を同定する方法及びキット、ならびに $\alpha 1$ IV型コラーゲンの発現抑制に有効な物質を同定する方法及びキットが提供された。

【発明を実施するための最良の形態】

【0009】

1. 糖尿病性腎症の検出方法及びキット

本発明は、生体試料におけるSmad1及び／又はSmad1活性化作用を有する物質の発現を測定することを含む、糖尿病性腎症の検出方法を提供する。

【0010】

生体試料は、Smad1及び／又はSmad1活性化作用を有する物質が検出されうるいかなる生体試料であってもよい。生体試料の例としては、腎臓組織切片、血液、血清、尿などを挙げることができる。

【0011】

Smadは哺乳類で1から9まで同定されており、Smad1は骨形成タンパク (BMP) シグナル伝達系の一員として知られており、BMPはアクチビン受容体キナーゼ2、3、6 (ALK2、ALK3、ALK6) を介して標的遺伝子転写を調節する (Zwijsen A. et al., FEBS Letters 546, 2003, 133-139) に関与しているということが知られている。BMPシグナルと特異的に関わるSmadは他にSmad5および8がある。他にTGF- β /アクチビンシグナルと特異的に関わりとされているSmadがあり、Smad2とSmad3が挙げられる。一方、Smad1は、内皮細胞および造血細胞等ではアクチビン受容体様キナーゼ1 (ALK1) を介してTGF- β のシグナルを伝達し標的遺伝子の転写調節を行う事も明らかにされている (Goumans MJ. et al., EMBO J., 2002, Apr 2, 21(7), 1743-53)。すなわち、Smad1を活性化する事により標的遺伝子の転写調整を行なうシグナル伝達系は主なものとしてBMP系とTGF- β 系の2通りが存在している (図8)。ただし、どの組み合わせによる経路が最も重要であるかは十分に検討されていない。

【0012】

「Smad1活性化作用を有する物質」は、Smad1を活性化することができる物質であればよく、アクチビン受容体様キナーゼ1 (ALK1)、アクチビン受容体様キナーゼ3 (ALK3) のように直接的にSmad1を活性化する物質、Bone Morphogenetic Proteins (BMPs)、TGF- β のようにのようアクチビン受容体キナーゼ (ALKs) アクチビン受容体様キナーゼ3 (ALK3) を活性化することにより間接的にSmad1を活性化する物質であってもよい。

【0013】

アクチビン受容体様キナーゼ1 (ALK1) は、TGF- β ファミリーのタンパクに結合する type I レセプターの1つであり、Smad1を活性化する作用を持つことが知られている (Chen Y G, et al., Smad1 recognition and activation by the ALK1 group of transforming growth factor- β family receptors J.Biol.Chem. Vol.274, No.6, 3672-3677, 1999)。ALK1の作用は明らかになっていない部分が多いが、ALK1はヒトでは胎盤、肺、血管内皮細

胞で多く発現しており、ALK1の欠損はオスラー病とも称される遺伝性出血性毛細血管拡張症（2型）を引き起こす。

【0014】

Bone Morphogenetic Proteins(BMPs)はTGF- β スーパーファミリーの一員であり、骨形成をはじめ発生期における四肢の発生や神経系の分化に関与している。しかし、近年、BMPsが後腎の発生の調節に関わるという報告がいくつかされ、注目されている。腎臓は中間中胚葉から発生し、前腎、中腎、後腎の3段階を経て形成される。前腎、中腎のほとんどは後に退行変性し、哺乳類成体において機能する腎臓は後腎である。BMPとそのレセプターの転写物は発生途上の後腎に局在し、BMP2、4、7はIn vitroで尿管の分岐の形態形成と分岐の構造の調節に直接または間接の役割を持つ。In vivoでは、BMP7無発現変異ホモのミュータントマウスとBMP4無発現変異ヘテロのミュータントマウスで腎臓の表現型に変化があると報告されている。(Martinez G, et al, Int J Dev Biol. 2002;46(4):525-33)。

【0015】

従来、糖尿病性腎症の発症および進展には高血糖状態下TGF- β がALK5を介してSmad2およびSmad3を活性化し α 1IV型コラーゲンを始めとする細胞外マトリックスを過剰に産生させる方向に働く経路が関連していると考えられていたが(Jin H. et al., Kidney International, 63, 2003, 2010-2019)、本研究は高血糖状態下においてSmad1を介して細胞外マトリックスの過剰産生をもたらす経路が存在することを初めて示すものである。

【0016】

Smad1及び／又はSmad1活性化作用を有する物質の発現は、核酸レベル（すなわち、mRNAの発現）及び／又はタンパク質レベルで測定することができる。

【0017】

核酸レベルでの測定については、生体試料から全RNAを抽出し、適当なプライマー対を用いて、RT-PCRによりSmad1及び／又はSmad1活性化作用を有する物質のmRNAを測定するとよい。適当なプライマー対は、例えば、NCBI RefseqデータベースのNM_005900のヒト由来のSmad1のmRNAの塩基配列（配列番号1）、NCBI RefseqデータベースのNM_000020のヒト由来のアクチビン受容体様キナーゼ1のmRNAの塩基配列（配列番号2）、GenBankデータベースのACCESSION NM_001200 VERSION NM_001200.1のBMP2のmRNAの塩基配列（配列番号3）、GenBankデータベースのACCESSION NM_001202 VERSION NM_001202.2のBMP4のmRNAの塩基配列（配列番号4）などの特定の領域を特異的に増幅できるように設計するとよい。適当なプライマー対の塩基配列を以下に示す。

Smad1のmRNAを特異的に増幅するRT-PCRに用いるフォワードプライマー：5'-ACTACCACCACGGCTTTCAC-3'（配列番号5）、リバースプライマー：5'-AATAGGATTGTGGGTGAGC-3'（配列番号6）

ALK1のmRNAを特異的に増幅するRT-PCRに用いるフォワードプライマー：5'-ccgtcaagatcttctcctcg-3'（配列番号7）、リバースプライマー：5'-tcatgtctgaggcgatgaag-3'（配列番号8）

BMP2のmRNAを特異的に増幅するRT-PCRに用いるフォワードプライマー：5'-cccagcgtgaagagagac-3'（配列番号9）、リバースプライマー：5'-gagaccgcagtcctgctaag-3'（配列番号10）

BMP4のmRNAを特異的に増幅するRT-PCRに用いるフォワードプライマー：5'-tgagcctttccagcaagttt-3'（配列番号11）、リバースプライマー：5'-cttccccgtctcaggtatca-3'（配列番号12）

あるいは、生体試料から全RNAを抽出し、適当なプローブを用いて、ノーザンハイブリダイゼーション法によりSmad1及び／又はSmad1活性化作用を有する物質のmRNAを測定してもよい。適当なプローブは、例えば、NCBI RefseqデータベースのNM_005900のヒト由来のSmad1のmRNAの塩基配列（配列番号1）、NCBI RefseqデータベースのNM_000020のヒト由来のアクチビン受容体様キナーゼ1のmRNAの塩基配列（配列番号2）、GenBankデータベ

ースのACCESSION NM_001200 VERSION NM_001200.1のBMP2のmRNAの塩基配列（配列番号3）、GenBankデータベースのACCESSION NM_001202 VERSION NM_001202.2のBMP4のmRNAの塩基配列（配列番号4）などを基にして、これらの配列の一部又は全部の領域に特異的にハイブリダイズするように設計するとよい。プローブは³²Pなどで標識されているとよい。

【0018】

タンパク質レベルでの測定については、例えば、Smad1に対する抗体及び／又はSmad1活性化作用を有する物質に対する抗体を用い、ウェスタンブロット、ELISAまたは免疫組織化学的解析などの方法で、Smad1及び／又はSmad1活性化作用を有する物質を測定するとよい。Smad1に対する抗体及び／又はSmad1活性化作用を有する物質に対する抗体は、蛍光色素、酵素、重金属などで標識されていてもよい（直接法）。あるいは、これらの抗体を標識する代わりに、これらの抗体（一次抗体）に特異的な抗体（二次抗体）を蛍光色素、酵素、重金属などで標識したものをを用いてもよい（間接法）。抗体は、試験片またはラテックス粒子などの固相担体に固定されていることが好ましい。

【0019】

Smad1及び／又はSmad1活性化作用を有する物質の発現を測定するとは、Smad1及び／又はSmad1活性化作用を有する物質の発現の有無を検出すること、Smad1及び／又はSmad1活性化作用を有する物質の発現量を定量することを包含する。

【0020】

本発明により、糖尿病性腎症を検出することができる。すなわち、Smad1及び／又はSmad1活性化作用を有する物質の発現は糖尿病性腎症の発症を示す。従来、糖尿病性腎症の診断には尿中IV型コラーゲン、尿中アルブミン測定が用いられているが、これらに代わる、あるいは補完する可能性がある。

【0021】

また、本発明により、糖尿病性腎症の進行度及び／又は治療の有効性を評価することができる。すなわち、Smad1及び／又はSmad1活性化作用を有する物質の発現量は糖尿病性腎症の重症度に比例する。また、糖尿病性腎症の治療が有効であれば、患者の回復とともにSmad1及び／又はSmad1活性化作用を有する物質の発現量が減少する。

【0022】

糖尿病性腎症とは、慢性的な高血糖状態により引き起こされる細小血管障害の一つである。病理学的には腎糸球体基底膜の肥厚、メサンギウム領域の拡大、糸球体の硬化病変を呈し、臨床的には蛋白尿（微量アルブミン尿）、高血圧、浮腫などの症候を呈して最終的には腎不全に陥ることが多い。また、糖尿病では糸球体以外の組織にも、細動脈硬化症、尿細管間質の変性・線維化などの異常が認められ、糸球体の病変をより悪化させている。すなわち、一定期間の糖尿病罹患の後、蛋白尿、高血圧、腎機能障害が徐々に進行していく病態を腎症と定義できる。

【0023】

近年、末期腎不全状態となり、新規に透析療法に導入されるケースの原疾患のうち30%以上が糖尿病性腎症であり、いまなお増加傾向にある。さらに、透析導入後の予後も必ずしも良好とはいえず、医療上、大きな問題となっている。したがって、糖尿病性腎症の発症・進展の機序を解明し、診断および治療の開発を行なうことは重要な課題となっている。（日本臨床55巻・1997年増刊号「糖尿病」（1））

また、本発明は、Smad1及び／又はSmad1活性化作用を有する物質の発現を測定するための試薬を含む、糖尿病性腎症を検出するためのキットを提供する。

【0024】

さらに、本発明は、Smad1及び／又はSmad1活性化作用を有する物質の発現を測定するための試薬を含む、糖尿病性腎症の進行度及び／又は治療の有効性を評価するためのキットを提供する。

【0025】

Smad1及び／又はSmad1活性化作用を有する物質の発現を測定するための試薬の例としては、Smad1のmRNAの塩基配列の特定の領域を特異的に増幅できるプライマー対、Smad1活性

化作用を有する物質のmRNAの塩基配列の特定の領域を特異的に増幅できるプライマー対、Smad1のmRNAの一部又は全部の領域に特異的にハイブリダイズすることができるプローブ、Smad1活性化作用を有する物質のmRNAの一部又は全部の領域に特異的にハイブリダイズすることができるプローブ、Smad1に対する抗体、Smad1活性化作用を有する物質に対する抗体などを挙げるることができる。これらのプライマー対及び抗体は、前述した通りである。

【0026】

本発明のキットは、さらに、逆転写酵素、DNAポリメラーゼ、RNase-free water、バッファー、対照mRNA、対照プライマー対、dNTP混合物、キットの使用説明書などを含んでもよい（核酸レベルでプライマー対を用いてSmad1及び／又はSmad1活性化作用を有する物質の発現を測定するキットの場合）。

【0027】

あるいはまた、本発明のキットは、さらに、転写用バッファー、ブロッキング試薬、洗浄液、キットの使用説明書などを含んでもよい（ウェスタンブロット法でSmad1及び／又はSmad1活性化作用を有する物質の発現を測定するキットの場合）。

【0028】

別の態様において、本発明のキットは、さらに、標識された二次抗体、基質（二次抗体が酵素で標識されている場合）、希釈液、反応停止剤、キットの使用説明書などを含んでもよい（ELISAでSmad1及び／又はSmad1活性化作用を有する物質の発現を測定するキットの場合）。

【0029】

さらに別の態様において、本発明のキットは、さらに、発色剤、過酸化水素水、バッファー、カウンター染色用色素、キットの使用説明書などを含んでもよい（免疫組織化学的解析でSmad1及び／又はSmad1活性化作用を有する物質の発現を測定するキットの場合）。

【0030】

2. 薬剤及び医薬組成物

本発明は、Smad1の発現を抑制する作用を有する物質を有効成分として含む、糖尿病性腎症の予防及び／又は治療剤を提供する。

【0031】

また、本発明は、Smad1の発現を抑制する作用を有する物質を有効成分として含む、細胞外マトリックスの増殖を阻害する薬剤を提供する。細胞外マトリックスとは、動物組織中の細胞の外側に存在する安定な生体構造物で、細胞が合成し、細胞外に分泌・蓄積した生体高分子の会合体である。培養細胞が合成・分泌し、細胞周辺に沈着させた構造物も含む。細胞外マトリックスは結合組織に多く見られるが、基底膜も細胞外マトリックスの一種である。

【0032】

さらに、本発明は、Smad1の発現を抑制する作用を有する物質を有効成分として含む、 $\alpha 1$ IV型コラーゲンの発現を抑制する薬剤を提供する。

【0033】

これらの薬剤は、医薬品として、あるいは実験用の試薬として用いることができる。

【0034】

Smad1の発現を抑制する作用を有する物質の例としては、Smad1に対するアンチセンスオリゴヌクレオチド（その塩基配列の一例を配列番号13に示す）、SANE(Smad1 Antagonistic Effector)(Raju GP et al., J Biol Chem. 2003 Jan 3;278(1):428-437)などが挙げられる。いずれのタンパク質も遺伝子組換え技術を用いて大腸菌、酵母菌、昆虫細胞、動物細胞、または無細胞タンパク合成系などで産生することが可能である。Smad1に対するアンチセンスオリゴヌクレオチドは、市販のDNA合成機を用いて公知の方法により合成することができる。

【0035】

上記のようなSmad1の発現を抑制する作用を有する物質は、1種類のみ用いてもよいし、複数種を組み合わせ使用してもよい。

【0036】

Smad1の発現を抑制する作用を有する物質は単独で、あるいは、薬理学的に許容され得る担体、希釈剤もしくは賦形剤とともに、適当な剤型の医薬組成物として、哺乳動物（例えば、ヒト、ウサギ、イヌ、ネコ、ラット、マウス）に対して経口的または非経口的に投与することができる。投与量は投与対象、疾患の種類、症状、投与ルートなどによっても異なるが、例えば、成人に投与する場合には、Smad1の発現を抑制する作用を有する物質（例えば、SANE）を1回量として通常10~100 mg/kg体重程度、好ましくは60~40 mg/kg体重程度を、1か月に1~2回程度、好ましくは治療開始時に同量を2~3日連続して、静脈注射により投与するとよい。他の非経口投与および経口投与の場合もこれに準ずる量を投与することができる。症状が特に重い場合にはその症状に応じて増量してもよい。

【0037】

経口投与のための組成物としては、固体または液体の剤形、具体的には錠剤（糖衣錠、フィルムコーティング錠を含む）、丸剤、顆粒剤、散剤、カプセル剤（ソフトカプセル剤を含む）、シロップ剤、乳剤、懸濁剤などがあげられる。かかる組成物は常法により製造することができ、製剤分野において通常用いられる担体、希釈剤もしくは賦形剤を含有してもよい。例えば、錠剤用の担体、賦形剤としては、乳糖、でんぷん、蔗糖、ステアリン酸マグネシウムなどがあげられる。

【0038】

非経口投与のための組成物としては、例えば、注射剤、坐剤などがあげられ、注射剤は静脈注射剤、皮下注射剤、皮内注射剤、筋肉注射剤、点滴注射剤などの剤型であるとよい。かかる注射剤は常法、すなわちSmad1の発現を抑制する作用を有する物質を通常注射剤に用いられる無菌の水性もしくは油性液に溶解、懸濁または乳化することによって調製される。注射用の水性液としては生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液などがあげられ、適当な溶解補助剤、例えば、アルコール（例えば、エタノール）、ポリアルコール（例えば、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール）、非イオン界面活性剤（例えば、ポリソルベート80、HCO-50 (polyoxyethylene (50mol) adduct of hydrogenated castor oil)）などと併用してもよい。油性液としてはゴマ油、大豆油などがあげられ、溶解補助剤として安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールなどを併用してもよい。調製された注射液は通常適当なアンプルに充填される。直腸投与に用いられる坐剤は、Smad1の発現を抑制する作用を有する物質を通常の坐薬用基剤に混合することによって調製することができる。

【0039】

上記の経口用または非経口用医薬組成物は、有効成分の投与量に適合するような投薬単位の剤形に調製されるとよい。かかる投薬単位の剤形としては、錠剤、丸剤、カプセル剤、注射剤（アンプル）、坐剤などが挙げられる。

【0040】

また、上記の医薬組成物は、Smad1の発現を抑制する作用を有する物質との配合により好ましくない相互作用を生じない限り、他の有効成分を含有してもよい。

【0041】

Smad1の発現を抑制する作用を有する物質がSmad1に対するアンチセンスオリゴヌクレオチドである場合には、公知の遺伝子導入法により被験者または被験者の細胞に導入することができる。例えば、Smad1に対するアンチセンスオリゴヌクレオチドをリポソームに封入し、細胞内に取り込む方法（"Lipidic vector systems for gene transfer" (1997) R. J. Lee and L. Huang Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst 14, 173-206; 中西守ら、蛋白質 核酸 酵素 Vol.44, No.11, 1590-1596 (1999)）、リン酸カルシウム法、エレクトロポレーション法、リポフェクション法、マイクロインジェクション法、遺伝子銃による方法などで行うことができる。Smad1に対するアンチセンスオリゴヌクレオチドを細胞に導入する場合には、例えば、疾患部位の細胞を一部取り出し、in vitroで遺伝子導入を行

った後、該細胞を再び組織に戻すことも可能であるし、あるいは、疾患部の組織に直接導入することもできる。

【0042】

Smad1に対するアンチセンスオリゴヌクレオチドを有効成分として含む医薬組成物は、必要により、医薬上許容される担体（例えば、生理食塩水、緩衝液などの希釈剤）を含むことができる。投与は、疾病の状態の重篤度や生体の応答性によるが、治療の有効性が認められるまで、あるいは疾病状態の軽減が達成されるまでの期間にわたり、適当な用量、投与方法、頻度で行えばよい。

【0043】

3. 糖尿病性腎症の予防及び／又は治療に有効な物質を同定する方法及びキット、細胞外マトリックスの増殖阻害に有効な物質を同定する方法及びキット、ならびに $\alpha 1$ IV型コラーゲンの発現抑制に有効な物質を同定する方法及びキット

本発明は、被験物質がSmad1の発現を抑制するか否かを判定することを含む、糖尿病性腎症の予防及び／又は治療に有効な物質を同定する方法を提供する。

【0044】

また、本発明は、被験物質がSmad1の発現を抑制するか否かを判定することを含む、細胞外マトリックスの増殖阻害に有効な物質を同定する方法及びキットも提供する。

【0045】

さらにまた、本発明は、 $\alpha 1$ IV型コラーゲンの発現抑制に有効な物質を同定する方法及びキットも提供する。

【0046】

本発明の上記方法の一実施態様について説明する。

【0047】

まず、Smad1を発現する能力を持つ細胞を用意する。Smad1を発現する能力を持つ細胞としてはいかなる細胞を用いてもよいが、その例として、動物の腎糸球体由来のメサンギウム細胞（例えば、後述の引用文献S1に記載のもの）、血管平滑筋細胞などを挙げることができる。

【0048】

Smad1を発現する能力を持つ細胞を被験物質の存在下及び非存在下でそれぞれ培養し、Smad1の発現を測定する。被験物質の例としては、例えば、ペプチド、タンパク、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液などが挙げられ、これら物質は新規な物質であってもよいし、公知の物質であってもよい。Smad1を発現する能力を持つ細胞の培養は、その細胞の培養に適した条件で行えばよい。例えば、マウスの腎糸球体由来のメサンギウム細胞（後述の引用文献S1）は、後述の実施例に記載のようにして培養することができる。Smad1の発現を測定する方法は上述の通りである。

【0049】

被験物質の存在下で細胞を培養した場合のSmad1の発現量と、被験物質の非存在下で細胞を培養した場合のSmad1の発現量とを比較する。前者が後者より少なければ、被験物質が糖尿病性腎症の予防及び／又は治療に有効であると判定する。あるいはまた、被験物質が細胞外マトリックスの増殖阻害に有効である、あるいは、 $\alpha 1$ IV型コラーゲンの発現抑制に有効であると判定する。反対に、前者が後者と同等であるか、あるいは前者が後者より多ければ、被験物質が糖尿病性腎症の予防及び／又は治療に有効ではないと判定する。あるいはまた、被験物質が細胞外マトリックスの増殖阻害に有効でない、あるいは、 $\alpha 1$ IV型コラーゲンの発現抑制に有効でないとして判定する。

【0050】

本発明は、Smad1の発現を測定するための試薬を含む、糖尿病性腎症の予防及び／又は治療に有効な物質を同定するためのキットも提供する。

【0051】

また、本発明は、Smad1の発現を測定するための試薬を含む、細胞外マトリックスの増殖阻害に有効な物質を同定するためのキットも提供する。

【0052】

さらに、本発明は、Smad1の発現を測定するための試薬を含む、 $\alpha 1$ IV型コラーゲンの発現抑制に有効な物質を同定するためのキットも提供する。

【0053】

Smad1の発現を測定するための試薬の例としては、Smad1のmRNAの塩基配列の特定の領域を特異的に増幅できるプライマー対、Smad1のmRNAの一部又は全部の領域に特異的にハイブリダイズすることができるプローブ、Smad1に対する抗体などを挙げることができる。これらのプライマー対及び抗体は前述した通りである。

【0054】

本発明のキットは、さらに、逆転写酵素、DNAポリメラーゼ、RNase-free water、バッファー、対照mRNA、対照プライマー対、dNTP混合物、キットの使用説明書などを含んでもよい（核酸レベルでプライマー対を用いてSmad1の発現を測定するキットの場合）。

【0055】

あるいはまた、本発明のキットは、さらに、転写用バッファー、ブルッキング試薬、洗浄液、キットの使用説明書などを含んでもよい（ウェスタンブロット法でSmad1の発現を測定するキットの場合）。

【0056】

別の態様において、本発明のキットは、さらに、標識された二次抗体、基質（二次抗体が酵素で標識されている場合）、希釈液、反応停止剤、キットの使用説明書などを含んでもよい（ELISAでSmad1の発現を測定するキットの場合）。

【0057】

さらに別の態様において、本発明のキットは、さらに、発色剤、過酸化水素水、バッファー、カウンター染色用色素、キットの使用説明書などを含んでもよい（免疫組織化学的解析でSmad1の発現を測定するキットの場合）。

【実施例】

【0058】

以下、本発明を実施例によって具体的に説明する。なお、これらの実施例は、本発明を説明するためのものであって、本発明の範囲を限定するものではない。

【0059】

マウスCol4遺伝子のプロモーター領域のCIV部位に結合するタンパクを同定するために、AGEs処理されたマウスのメサングウム細胞よりcDNAライブラリーを構築した。本実験ではYeast one-hybrid systemを用い、ライブラリーより特異的な転写因子をコードするクローンを選択し、そのクローンがSmad1をコードしていることを同定した。Smad1のCol4プロモーター領域への結合をin vivoで確認するために、クロマチン免疫沈降法（ChIP）を行なった。沈降したDNAを精製しCol4のプロモーター領域をPCRで検出した。抗Smad1抗体は、AGEs処理された細胞より得たCIV-1部位を含むクロマチンを沈降させた（図1A）。BSA処理された細胞では沈降しなかった。Smad4もまたCIV-1部位に結合することを見出した（図1A）。次にCol4の転写活性をレポーターアッセイにより検討した。LacZの前にCIV-1プロモーターをつないだベクターを作成し、野生型Smad1ベクターと共にCOS7細胞に同時導入した。まず、Western blotによりSmad1の発現を確認し（図1B）、野生型Smad1ベクターを導入した細胞上清にリン酸化Smad1（p Smad1）を検出した。野生型Smad1の同時導入によりCol4単独（Mock）の場合と比較して β -ガラクトシダーゼ活性は18倍であった（図1C）。 β -ガラクトシダーゼ活性はルシフェラーゼ活性により補正し、Mockベクターを同時導入した細胞での活性を基準とした。Mockは同時導入細胞の β -ガラクトシダーゼ活性に全く影響を与えなかった。この結果は、Smad1が確かにCol4遺伝子転写を誘導することを示唆している。つまり、Smad1はCol4の転写を調節している。

【0060】

Smad1がAGEsによりアップレギュレートされているのかを確認するために、AGEs存在下・非存在下でのメサンギウム細胞でのSmad1の発現を調べた。AGE存在下ではSmad1のmRNA量は経時的に上昇した(図2A)。同様にCol4のmRNAもSmad1の転写が上昇するのと平行に上昇した。しかし、BSA存在下ではSmad1の転写もCol4の転写も変化しなかった。Smad1はリン酸化され、核内に移動し標的遺伝子の転写調節をすることで知られている(11)(12)。従って、次に本発明者らはAGEsによりSmad1のリン酸化および細胞内の移動が影響を受けるかという事をメサンギウム細胞で検討した(図2B)。mRNAの結果と一致し、AGEs存在下72時間の培養で細胞質に優先的に存在した。さらに、AGEs存在下120時間の培養でSmad1とpSmad1の核内への集積が認められた。BSA存在下での培養ではSmad1とpSmad1はわずかししか発現しない。同様にAGEs処理細胞の抽出液にはSmad1とpSmad1が認められたが、BSA処理細胞の抽出液には認められなかった(図2C)。これらの知見は、Col4の調節がAGEs存在下においてSmad1の発現と連動していることを示す。

【0061】

AGE誘導性のCol4の過剰産生を媒介するシグナル伝達系でのSmad1の重要性を確認するために、本発明者らはアンチセンス遺伝子を用いて特異的にこの系を阻害した。Smad1のAGEによる誘導はアンチセンス遺伝子の存在により全く消失したが、コントロールオリゴ存在下では消失しなかった(4ミスマッチオリゴ)(図3A、B)。そして、Smad1の阻害によりCol4の過剰発現が著しく減弱した。Smad1のミスマッチオリゴはCol4の発現には影響しなかった(図3C)。これらのデータはSmad1がCol4の発現制御に決定的な役割をになっていることを示す。糖尿病患者において糖尿病性腎症の発症・進行は罹患率・死亡率の両方において临床上重大な問題である。現行の治療方法において血糖値のコントロールが良好であれば糖尿病性腎症の発症・進行を遅らせることはできるが、予防はすることができないことが明らかとなっている。(1)(2) Smad1に対するアンチセンスオリゴはAGEによるCol4の過剰発現を著しく減弱させる。これらの知見はSmad1シグナル系の阻害により、糖尿病性腎症におけるメサンギウム細胞のECMの産生を防げるという可能性を示唆している。本実験の効果はAGEsの持続的な刺激存在下において認められたので、Smad1は糖尿病の合併症の新たなターゲットと示唆され、現行の治療法に組み合わせることにより効果を発揮するものと思われる。AGEs処理によるSmad1発現のメカニズムをさらに解明するために、本発明者らはメサンギウム細胞におけるactivin-receptor like kinase 1(ALK1)の発現を調べた。ALK1はTGF- β 受容体ファミリーのタンパク質の1つであり、Smad1とSmad5を特異的にリン酸化する働きがある。ALK1は血管内皮細胞で多く発現しており(13)(14)、血管の成熟と安定化に重要であるといわれている(15)(16)。ALK1の変異は、Osler-Rendu-Weber症候群としても知られるタイプII遺伝性出血性毛細血管拡張症を起こす(17)。ALK1はTGF- β からのシグナルをSmad1を解して伝達し、TGF- β 反応性遺伝子群の調節をしているという最近の報告がある(18)(19)。本発明者らは、AGEs処理されたメサンギウム細胞におけるALK1の発現をRNase protection assay法およびWestern blotting法を用いてそれぞれmRNA、タンパク質の両方を検出した(データは示さず)。最後に、ヒトの糖尿病性腎症における糸球体でのSmad1およびALK1の発現を調べた。糖尿病性腎症および健常腎のバイオプシーを試料として間接抗体法を実施したところ、糸球体でのSmad1とALK1抗体に対する反応性は、糖尿病性腎症である糸球体では硬化性病変の重症度と比例したが、健常腎ではほとんど発現が認められなかった(図4)。これらの組織学的な知見はCol4の正の調節とSmad1/ALK1シグナル伝達系に関係があることを示唆している。ヒトの糖尿病性腎症は長年にわたってゆっくりと進行するものなので、この現象の詳細な評価のためには糖尿病とSmad1およびALK1の関係を明らかにしなければならなさそうだ。

【0062】

マウスでのSmad1遺伝子の特異的な破壊は胎児期において致死性であることから、Smad1

は早期の胚発生に決定的な役割を果たすと考えられる (20)。しかし、胎生期早期における致死性のために、Smad1のin vivoでの役割、とりわけ成人についてはあまりよくわかっていない。Smad1はBMPシグナルを伝達するものとして知られ (12)、特に腎の発生において重要であるといわれている (21)。しかし、Smad1はadult mouseの糸球体では発現がみられない (22)。本実験は、初めてadult mouseでSmad1の発現がAGEsにより誘導されることを示した。本発明者らは、AGEsへの慢性的な暴露がSmad1発現の持続的な上昇、Col4の過剰発現を観察し、Smad1が糖尿病存在下では決定的な調節因子であることを示唆した。AGEsは糖尿病の合併症に有意に関与しているため、本発明者らの研究結果はコラーゲンの沈着を伴う糖尿病や老化のような疾患に有用であると考えられる。GMBの構造の変化は糖尿病性腎症において、微量アルブミン尿がおきるより以前の初期に起きるため、Smad1は糖尿病性腎症の最も初期的なマーカーになるであろう。最近の報告でALK1がSmad1を介してTGF- β のシグナル伝達を仲介することが示された (18) (19)。従って、本発明者らはマウスのメサンギウム細胞とヒトの腎組織でのALK1の発現を検討した。その結果、ALK1とSmad1は腎糸球体において糖尿病の進行に対応して発現することを本実験で示した。これらの結果はコラーゲンの病的な産生を抑制することにより、さまざまな臓器で起きる糖尿病の合併症の治療につながる (1)。この結果は持続的な血糖値の上昇がAGEsの上昇をもたらし、長期的な糖尿病の合併症の進展に必須であることを確認するものである (23) (24)。糖化によりコラーゲンがクロスリンクし動脈硬化をすすめる (25)。さらに、AGEsと糖尿病の合併症と動脈硬化の相関がAGEsに特異的な阻害剤を使った研究により近年強調されている (26) (27)。Col4は血管基底膜の主要な構成成分であるにもかかわらず、糖尿病や老化におけるCol4の産生増進については、細胞レベルでも分子レベルでもメカニズムはほとんどわかっていない。従って、本発明者らはALK1/Smad1シグナル伝達系が糖尿病と老化の両方で、ECMを過剰発現させることにより動脈硬化の進展に関わっていると推測している。糖尿病や老化の動物モデルを用いてALK1/Smad1シグナル伝達系の解明をさらに進めるべく研究中である。

【0063】

さらに、AGEs存在下にて培養したメサンギウム細胞におけるmRNAの発現量をBSA存在下での培養メサンギウム細胞のそれと比較した (図5)。AGEs存在下ではBMPRII、BMP4の顕著な転写増強が認められる。Smad1の転写量に大きな変動は認められないが、Smad1は転写因子であるため発現量の大きな変動は捕え難く、また、転写因子の作用に重要である細胞質から核内への移行やリン酸化などはマイクロアレイの結果に反映しないためであると考えられる。

【0064】

また、糖尿病性腎症患者の尿中BMP2をウェスタンブロット法で測定したところ、治療による疾患の改善とともに尿中BMP2の減少が認められた (図6)。

【0065】

また、TGF- β シグナルによる慢性的刺激によりBMP2およびBMP4タンパクの著明な発現亢進が認められ (図7)、TGF- β シグナル伝達系において中心的な機能をこれらBMPsが担っている可能性が示唆される。

【0066】

実験に用いた材料と方法

Cell culture

正常な4週令のマウス (C57BL/6JxSJL/J) の腎糸球体由来のメサンギウム細胞株を樹立し、以前に報告した方法にしたがってメサンギウム細胞であることを同定した (S1)。メサンギウム細胞株は1mMグルタミン、100units/ml ペニシリン、100mg/ml ストレプトマイシン、20%FCSを加えてB培地 (最少栄養培地と微量元素を添加したF12培地の3:1混合培地) にて培養した。培養細胞は腎糸球体メサンギウム細胞と判定されるための一般的な基準を満たした (S2)。AGEsまたはBSA処理は以前に報告した方法に従って行なった (S3)。

cDNA library construction and Yeast One-hybrid screening
AGEs処理をしたマウス腎系球体培養細胞より cDNA を調製し pGADベクターに挿入した。Yeast One-hybrid screeningはMATCHMAKER One-hybrid(Clontech, Palo Alto, California)キットを用いて行なった。マウス由来Col4遺伝子の27bpのタンデムリピート配列 (TTCCTCCCCTGGAGGAGCGCCGCCCG : CIV-1) (配列番号14) を酵母のintegration and reporter vectorであるpHISi (MATCHMAKER One-hybrid(Clontech, Palo Alto, California) またはpLacZi (MATCHMAKER One-hybrid(Clontech, Palo Alto, California))につないで CIV-1-pHISiとCIV-1-pLacZiベクターを作成し、それを直線化して酵母株YM4271 (MATCHMAKER One-hybrid(Clontech, Palo Alto, California)) の染色体に挿入した。CIV-1-pHISiとCIV-1-pLacZiを挿入した酵母を用いてAGEs処理したマウスメサングウム細胞由来の cDNAライブラリーのOne-hybrid screeningを行なった。45mM 3-アミノ-1,2,4-トリアゾール(3-AT)を添加したSD/-His/-Leu培地でポジティブクローンを選択した。偽陽性クローンを除くために β -galactosidase filter lift assay(Clontech)を行ない、残った酵母のコロニーより回収したプラスミドを大腸菌 (DH5 α) に導入した。

ChIP assay

ChIP assay はLuo (S5) の方法に従った。抗Smad1抗体、抗Smad-4抗体 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, California) 、コントロールIgGを使用して4℃でオーバーナイトした。CIV-1領域をPCRで増幅した。使用プライマーは5' 側 (5' -GGAGCTCCCAATTTGTTG-3') (配列番号15) 、3' 側 (5' -CAGCCTCCGCCTCTTACC-3') (配列番号16) である。PCR産物はアガロースゲル電気泳動で100bp前後であった。

Reporter assay

1.3×10^5 COS7細胞を10%FBSを添加したDulbeccoのイーグル培地 (DMEM) を用いて6穴プレートで培養した。8時間後に750ngのCIV-1-LacZと同量のSmad-1を組み込んだベクター、あるいはダミーであるmockベクターを同時導入した。そして、内部コントロールとして75ngのCMV-LUC(CMVプロモーターの下流に蛍ルシフェラーゼ遺伝子をつないだもの)も導入した。導入にはFuGENE6 (Roche molecular biochemicals, Indianapolis, Indiana) を使用した。48時間後に細胞をreporter lysis bufferに回収し、 β -ガラクトシダーゼ活性とルシフェラーゼ活性をそれぞれ β -galactosidase Reporter System(BD Bioscience, San Jose, California)とLuciferase Reporter Assay System(Promega, Madison, Wisconsin)を用いて測定し、 β -ガラクトシダーゼ活性はルシフェラーゼ活性の測定結果で補正した。

RNase protection assay

既報 (S6) に従いRNase protection assayを行なった。

このアッセイに用いたプローブの塩基配列はAcc No. U58992の1172-1433の配列で以下の通りである。

```
cccaccacc gtctgcaaga tccccagcgg gtgcagcttg aaaatcttca acaaccaaga gtttgctcag
ctactggcgc agtctgtgaa
ccacgggttc gagaccgtgt atgaactcac caaaatgtgc actattcgga tgagcttcgt
gaagggttgg ggagccgaat accaccggca ggatgttacc agcaccacct gctggattga
gatccatctg catggccctc tccagtggct ggataaggtt ctgaccaga tgg
(配列番号17)
```

Western blotting

メサングウム細胞をAGEsまたは対照としてBSA存在下で72時間培養した。Sample bufferに細胞を回収し、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動で解析し、ニトロセルロース膜にブロッティングし、501倍希釈した抗Smad1抗体および抗pSmad1抗体 (Santa Cruz Biotechnology) を反応させ、enhanced chemiluminescence detection system (Invitrogen, Carlsbad, California) で検出した。

Immunostaining of cultured cells cytosections

培養細胞を4%パラホルムアルデヒドで固定し、101倍希釈した抗Smad1抗体 (Santa Cruz Biotechnology)、101倍希釈した抗pSmad-1抗体 (Calbiochem) を使用した。適量のフルオロセインイソチオシアネートを結合二次抗体をレーザー顕微鏡と蛍光顕微鏡 (Olympus, Tokyo, Japan) で観察した。

Smad1 morpholino antisense oligonucleotide

Smad1に対する25塩基の長さのアンチセンスオリゴを合成した (Genetools LLC, Philomath, Oregon)。配列は5' -CAAGCTGGTCACATTCATAGCGGCT-3' (配列番号13) である。対照として合成オリゴ5' -CAAGCTcGTCACATTCaAGCcGCT-3' (配列番号18) を使用し、既報 (S7) の通り in vitro RNA transcriptionを行なった。

Histology

病理組織学的検討をヒト組織を用いて行なった。本実験はヘルシンキ宣言にもとづき倫理委員会の承認を得て行なった。患者様からは組織提供および研究に使用するための承諾を書面により得ている。5例の糖尿病性腎症の腎生検試料の提供を得た。対照とした正常組織は腎の悪性腫瘍により腎摘出手術を受けた患者様の腎の正常な皮質を腫瘍の反対側よりサンプリングした。腎組織は凍結し5 μ m厚の切片を切り出しアセトンで5分間固定した。内因性のペルオキシダーゼの影響を消すために1%過酸化水素メタノール中に入れ暗中で20分間インキュベートした。さらに、非特異的な染色を防ぐため、適量の免疫前の血清を用いて室温で20分間インキュベートした。抗Smad1抗体 (Santa Cruz Biotechnology) および抗ALK1抗体 (R&D, Minkinley Place, Nebraska) を一次抗体として免疫染色を行なった。

マイクロアレイによる発現量の解析

AGEs存在下にて培養したメサングウム細胞及びBSA存在下で培養したメサングウム細胞のそれぞれにおける各mRNAの発現量をAgilent Technologies Mouse cDNA Microarray Kitを用いて測定した。

引用文献

1. The Diabetes Control and Complications Trial Research Group. N. Engl. J. Med. 329, 977-986 (1993).
2. UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. Lancet 352, 837-853 (1998)
3. H. Vlassara, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 11704-11708 (1994).
4. M. Brownlee, A. Cerami, H. Vlassara, N. Engl. J. Med. 318, 1315-1321 (1988).
5. T. Doi, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 89, 2873-2877 (1992).
6. H. Vlassara, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 89, 12043-12047 (1992).
7. M. S. Huijberts, et al., J. Clin. Invest. 92, 1407-1411 (1993).
8. S. L. Park, et al., Nature Med. 9, 1025-1031 (1998)
9. L. A. Bruggeman, P. D. Burbelo, Y. Yamada, P. E. Klotman, Oncogene 7, 1497-1502 (1992).
10. N. Iehara, H. Takeoka, Y. Yamada, T. Kita, T. Doi, Kidney Int. 50, 1166-1172 (1996).
11. C. H. Heldin, K. Miyazono, P. ten Dijke, Nature 390, 465-471 (1997).

12. J. Massague, D Wotton, EMBO J. 19, 1745-1754 (2000).
 13. B. A. Roelen, M. A. van Rooijen, C. L. Mummery, Dev. Dyn. 209, 418-430 (1997).
 14. L. Attisano, et al., Cell 75, 671-680 (1993)
 15. L. D. Urness, L. K. Sorensen, D. Y. Li, Nature Genet. 26, 328-331 (2000).
 16. J. Larsson, et al., EMBO J. 20, 1663-1673 (2001).
 17. D. W. Johnson, et al., Nature Genet. 13, 189-195 (1996)
 18. S. P. Oh, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 97, 2626-2631 (2000).
 19. Y. G. Chen, J. Massague, J. Biol. Chem. 274, 3672-3677 (1999).
 20. K. D. Tremblay, N. R. Dunn, E. J. Robertson, Development 128, 3609-3621 (2001)
 21. A. Dick, W. Risau, H. Drexler, Dev. Dyn. 211, 293-305 (1998)
 22. S. Huang, K. C. Flanders, A. B. Roberts, Gene, 258, 43-53 (2000)
 23. H. Vlassara, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 91, 11704-11708 (1994).
 24. Z. Makita, et al., N. Engl. J. Med. 325, 836-842 (1991).
 25. O. Chappey, C. Dosquet, M. P. Wautier, J. L. Wautier, Eur. J. Clin. Invest. 27, 97-108 (1997)
 26. Vasan, et al., Nature 382, 275-278 (1996)
 27. M. Brownlee, H. Vlassara, A. Kooney, P. Ulrich, A. Cerami, Science 27, 1629-1632 (1986).
 28. We thank K. Miyazono for providing a plasmid encoding Smad1, and Y. Takishita for his assistance with histological analysis. We also thank the members of our laboratory for discussion.
- Supported by Grant-in Aid from the Ministry of Education, Science, Sports and Culture of Japan.
- S1. C. W. Yang, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 91, 9436-9440 (1994).
 - S2. M. Davies, The mesangial cell: a tissue culture view. Kidney Int. 45, 320-327 (1994).
 - S3. N. Iehara, H. Takeoka, Y. Yamada, T. Kita, T. Doi, Kidney Int. 50, 1166-1172 (1996).
 - S4. P. D. Burbelo, A. Utani, Z. Q. Pan, Y. Yamada, Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 90, 11543-11547 (1993).
 - S5. R. X. Luo, A. A. Postigo, D. C. Dean, Cell 92, 463-473 (1998).
 - S6. H. Abe, N. Iehara, K. Utsunomiya, T. Kita, T. Doi, J. Biol. Chem. 274, 20874-20878 (1999).
 - S7. D. G. Ahn, M. J. Kourakis, L. A. Rohde, L. M. Silver, R. K. Ho, Nature 417, 754-758 (2002).

【産業上の利用可能性】

【0067】

本発明により、IV型コラーゲンの過剰産生に直接関わっている物質としてSmad1が同定され、Smad1が糖尿病性腎症の病因として決定的な役割を持つことが示された。これにより、糖尿病性腎症の検出が可能となり、さらに、糖尿病性腎症の予防及び／又は治療剤、細胞外マトリックスの増殖を阻害する薬剤、 $\alpha 1$ IV型コラーゲンの発現を抑制する薬剤が提供された。また、本発明により、糖尿病性腎症の予防及び／又は治療に有効な物質を同定する方法及びキット、細胞外マトリックスの増殖阻害に有効な物質を同定する方法及びキット、ならびに $\alpha 1$ IV型コラーゲンの発現抑制に有効な物質を同定する方法及びキットが提供された。

【図面の簡単な説明】

【0068】

【図1】 Smad1によりCol4プロモーターが活性化されることを示す。(A):AGEs存在下またはBSA存在下(対照)での培養メサングウム細胞を用い、図に示した抗体を用いてクロマチン免疫沈降法を行なった。CIV-1モチーフに対するプライマーを用いてPCRを行なった。3回繰り返し行なった実験のうちの1回の結果を示す。(B):CIV-1-LacZレポータープラスミドと野生型Smad1を入れたベクター、またはベクターのみ(mock)をCMV-LUCを内部コントロールとして培養細胞に同時導入した。細胞抽出液をウェスタンブロット法で抗Smad1抗体と抗pSmad1抗体で解析した。3回繰り返し行なった実験の1回の結果を示す。(C):48時間後、培養細胞を溶解し、 β -ガラクトシダーゼ活性とルシフェラーゼ活性を測定した。測定は各3回行いSDを示す。

【図2】 AGEsへの暴露によりダイナミックに変動するSmad1発現を示す。(A):AGEsまたはBSAに暴露したメサングウム細胞のSmad1とCol4mRNA発現の経時的変化をRNA protection assayで見た。AGEsへの持続的な暴露はSmad1の発現を持続的に亢進し、Col4の発現も平行して増える。3回繰り返し行なった実験の1回の結果を示した。(B):AGEsまたはBSA存在下で72時間、120時間培養したメサングウム細胞の免疫蛍光写真。3回繰り返し行なった実験の1回の結果を示す。(C):AGEsまたはBSA存在下で72時間培養された際のSmad1とpSmad1をウェスタンブロットで見た。3回繰り返し行なった実験の1回の結果を示した。

【図3】 メサングウム細胞におけるSmad1に対する特異的アンチセンスオリゴの効果を示す。(A):72時間のAGEs処理後、メサングウム細胞はSmad1に対するアンチセンスオリゴ、または4 mismatchesオリゴ(対照)で16時間処理した。アンチセンスオリゴで処理された細胞のメサングウム細胞を抗Smad1抗体(緑)で免疫蛍光染色し、さらにDAPI染色した(blue)。3回繰り返し行なった実験の1回の結果を示す。(B):AGEs暴露後のメサングウム細胞にSmad1に対するアンチセンスオリゴまたは4 mismatchesオリゴ(対照)を導入した。3回繰り返し行なった実験の1回の結果を示す。(C):Smad1に対するアンチセンスオリゴはSmad1の発現亢進を阻害するが、同時にCol4の発現亢進も阻害する。3回繰り返し行なった実験の1回の結果を示す。

【図4】 Smad1とALK1の発現を糖尿病性腎症のヒトで検出した結果を示す。糖尿病5例、非糖尿病3例の糸球体を抗Smad1抗体と抗ALK1抗体を用いて免疫組織染色した。糸球体でのSmad1とALK1の発現は糖尿病では顕著に認められたが、非糖尿病では認められなかった。すべての切片はヘマトキシリンにより対比染色した。写真の拡大率はすべて400倍である。

【図5】 AGEs存在下にて培養したメサングウム細胞におけるmRNAの発現量をBSA存在下での培養メサングウム細胞のそれと比較した結果を示す。

【図6】 糖尿病性腎症患者の尿中BMP2をウェスタンブロット法で測定した結果を示す。

【図7】 TGF- β シグナルによる慢性的刺激下でのBMP2およびBMP4タンパクの発現をウェスタンブロット法で測定した結果を示す。

【図8】 シグナル伝達経路の模式図である。

【配列表フリーテキスト】

【0069】

<配列番号1>

配列番号1は、ヒト由来のSmad1のmRNAの塩基配列を示す。

<配列番号2>

配列番号2は、ヒト由来のALK1のmRNAの塩基配列を示す。

<配列番号3>

配列番号3は、ヒト由来のBMP2のmRNAの塩基配列を示す。

<配列番号4>

配列番号4は、ヒト由来のBMP4のmRNAの塩基配列を示す。

<配列番号5>

配列番号 5 は、Smad1 の mRNA を特異的に増幅する RT-PCR に用いる フォワードプライマーの塩基配列を示す。

< 配列番号 6 >

配列番号 6 は、Smad1 の mRNA を特異的に増幅する RT-PCR に用いる リバースプライマーの塩基配列を示す。

< 配列番号 7 >

配列番号 7 は、ALK1 の mRNA を特異的に増幅する RT-PCR に用いる フォワードプライマーの塩基配列を示す。

< 配列番号 8 >

配列番号 8 は、ALK1 の mRNA を特異的に増幅する RT-PCR に用いる リバースプライマーの塩基配列を示す。

< 配列番号 9 >

配列番号 9 は、BMP2 の mRNA を特異的に増幅する RT-PCR に用いる フォワードプライマーの塩基配列を示す。

< 配列番号 10 >

配列番号 10 は、BMP2 の mRNA を特異的に増幅する RT-PCR に用いる リバースプライマーの塩基配列を示す。

< 配列番号 11 >

配列番号 11 は、BMP4 の mRNA を特異的に増幅する RT-PCR に用いる フォワードプライマーの塩基配列を示す。

< 配列番号 12 >

配列番号 12 は、BMP4 の mRNA を特異的に増幅する RT-PCR に用いる リバースプライマーの塩基配列を示す。

< 配列番号 13 >

配列番号 13 は、Smad1 に対する アンチセンスオリゴヌクレオチドの塩基配列を示す。

< 配列番号 14 >

配列番号 14 は、マウス由来 Col4 遺伝子の 27bp の タンデムリピート配列を示す。

< 配列番号 15 >

配列番号 15 は、ChIP assay に使用した 5' 側の プライマーの塩基配列を示す。

< 配列番号 16 >

配列番号 16 は、ChIP assay に使用した 3' 側の プライマーの塩基配列を示す。

< 配列番号 17 >

配列番号 17 は、RNase protection assay に使用した プローブの塩基配列を示す。

< 配列番号 18 >

配列番号 18 は、合成オリゴヌクレオチドの塩基配列を示す。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> HuBit Genomix, Inc.
Doi, Toshio

<120> A method for detecting diabetic nephropathy and kits therefor, agents for preventing and/or treating diabetic nephropathy, a method for identifying substances effective in prevention and/or treatment and kits therefor

<130> P03-045

<140>

<141>

<160> 18

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 1990

<212> mRNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (433)..(1830)

<400> 1

gaattccggg ggtattggca gctgaggagt ggaggctggg cagctccgac tccctgacgc 60

cagcgcgacc agatcaatcc aggctccagg agaaagcagg cgggcgggcg gagaaaggag 120

aggccgagcg gctcaaccgg ggccgaggct cggggagcgg agagtggcgc accgcccggc 180

cgtccggacc cgggccgcga gaccccgtc gcccgccac tcgtgctccc gcacggacgg 240

gcgcgccgcc aaccgggtgc tgactgggtt acttttttaa aactaggaa tggtaatttc 300

tactcttctg gacttcaaac taagaagta aagagacttc tctgtaaata aacaaatctc 360

ttctgctgtc cttttgcatt tggagacagc tttatttcac catatccaag gagtataact 420

agtgctgtca tt atg aat gtg aca agt tta ttt tcc ttt aca agt cca gct 471

Met Asn Val Thr Ser Leu Phe Ser Phe Thr Ser Pro Ala

1

5

10

gtg aag aga ctt ctt ggg tgg aaa cag ggc gat gaa gaa gaa aaa tgg 519

Val	Lys	Arg	Leu	Leu	Gly	Trp	Lys	Gln	Gly	Asp	Glu	Glu	Glu	Lys	Trp		
15						20					25						
gca	gag	aaa	gct	gtt	gat	gct	ttg	gtg	aaa	aaa	ctg	aag	aaa	aag	aaa	567	
Ala	Glu	Lys	Ala	Val	Asp	Ala	Leu	Val	Lys	Lys	Leu	Lys	Lys	Lys	Lys		
30					35				40						45		
ggt	gcc	atg	gag	gaa	ctg	gaa	aag	gcc	ttg	agc	tgc	cca	ggg	caa	ccg	615	
Gly	Ala	Met	Glu	Glu	Leu	Glu	Lys	Ala	Leu	Ser	Cys	Pro	Gly	Gln	Pro		
			50					55					60				
agt	aac	tgt	gtc	acc	att	ccc	cgc	tct	ctg	gat	ggc	agg	ctg	caa	gtc	663	
Ser	Asn	Cys	Val	Thr	Ile	Pro	Arg	Ser	Leu	Asp	Gly	Arg	Leu	Gln	Val		
			65					70					75				
tcc	cac	cgg	aag	gga	ctg	cct	cat	gtc	att	tac	tgc	cgt	gtg	tgg	cgc	711	
Ser	His	Arg	Lys	Gly	Leu	Pro	His	Val	Ile	Tyr	Cys	Arg	Val	Trp	Arg		
		80					85					90					
tgg	ccc	gat	ctt	cag	agc	cac	cat	gaa	cta	aaa	cca	ctg	gaa	tgc	tgt	759	
Trp	Pro	Asp	Leu	Gln	Ser	His	His	Glu	Leu	Lys	Pro	Leu	Glu	Cys	Cys		
	95					100					105						
gag	ttt	cct	ttt	ggt	tcc	aag	cag	aag	gag	gtc	tgc	atc	aat	ccc	tac	807	
Glu	Phe	Pro	Phe	Gly	Ser	Lys	Gln	Lys	Glu	Val	Cys	Ile	Asn	Pro	Tyr		
110					115				120						125		
cac	tat	aag	aga	gta	gaa	agc	cct	gta	ctt	cct	cct	gtg	ctg	gtt	cca	855	
His	Tyr	Lys	Arg	Val	Glu	Ser	Pro	Val	Leu	Pro	Pro	Val	Leu	Val	Pro		
				130				135						140			
aga	cac	agc	gaa	tat	aat	cct	cag	cac	agc	ctc	tta	gct	cag	ttc	cgt	903	
Arg	His	Ser	Glu	Tyr	Asn	Pro	Gln	His	Ser	Leu	Leu	Ala	Gln	Phe	Arg		
			145					150					155				
aac	tta	gga	caa	aat	gag	cct	cac	atg	cca	ctc	aac	gcc	act	ttt	cca	951	
Asn	Leu	Gly	Gln	Asn	Glu	Pro	His	Met	Pro	Leu	Asn	Ala	Thr	Phe	Pro		
		160					165					170					
gat	tct	ttc	cag	caa	ccc	aac	agc	cac	ccg	ttt	cct	cac	tct	ccc	aat	999	
Asp	Ser	Phe	Gln	Gln	Pro	Asn	Ser	His	Pro	Phe	Pro	His	Ser	Pro	Asn		
	175					180					185						
agc	agt	tac	cca	aac	tct	cct	ggg	agc	agc	agc	agc	acc	tac	cct	cac	1047	
Ser	Ser	Tyr	Pro	Asn	Ser	Pro	Gly	Ser	Ser	Ser	Ser	Thr	Tyr	Pro	His		
190					195				200						205		
tct	ccc	acc	agc	tca	gac	cca	gga	agc	cct	ttc	cag	atg	cca	gct	gat	1095	
Ser	Pro	Thr	Ser	Ser	Asp	Pro	Gly	Ser	Pro	Phe	Gln	Met	Pro	Ala	Asp		
				210				215						220			

acg ccc cca cct gct tac ctg cct cct gaa gac ccc atg acc cag gat 1143
 Thr Pro Pro Pro Ala Tyr Leu Pro Pro Glu Asp Pro Met Thr Gln Asp
 225 230 235

ggc tct cag ccg atg gac aca aac atg atg gcg cct ccc ctg ccc tca 1191
 Gly Ser Gln Pro Met Asp Thr Asn Met Met Ala Pro Pro Leu Pro Ser
 240 245 250

gaa atc aac aga gga gat gtt cag gcg gtt gct tat gag gaa cca aaa 1239
 Glu Ile Asn Arg Gly Asp Val Gln Ala Val Ala Tyr Glu Glu Pro Lys
 255 260 265

cac tgg tgc tct att gtc tac tat gag ctc aac aat cgt gtg ggt gaa 1287
 His Trp Cys Ser Ile Val Tyr Tyr Glu Leu Asn Asn Arg Val Gly Glu
 270 275 280 285

gcg ttc cat gcc tcc tcc aca agt gtg ttg gtg gat ggt ttc act gat 1335
 Ala Phe His Ala Ser Ser Thr Ser Val Leu Val Asp Gly Phe Thr Asp
 290 295 300

cct tcc aac aat aag aac cgt ttc tgc ctt ggg ctg ctc tcc aat gtt 1383
 Pro Ser Asn Asn Lys Asn Arg Phe Cys Leu Gly Leu Leu Ser Asn Val
 305 310 315

aac cgg aat tcc act att gaa aac acc agg cgg cat att gga aaa gga 1431
 Asn Arg Asn Ser Thr Ile Glu Asn Thr Arg Arg His Ile Gly Lys Gly
 320 325 330

gtt cat ctt tat tat gtt gga ggg gag gtg tat gcc gaa tgc ctt agt 1479
 Val His Leu Tyr Tyr Val Gly Gly Glu Val Tyr Ala Glu Cys Leu Ser
 335 340 345

gac agt agc atc ttt gtg caa agt cgg aac tgc aac tac cat cat gga 1527
 Asp Ser Ser Ile Phe Val Gln Ser Arg Asn Cys Asn Tyr His His Gly
 350 355 360 365

ttt cat cct act act gtt tgc aag atc cct agt ggg tgt agt ctg aaa 1575
 Phe His Pro Thr Thr Val Cys Lys Ile Pro Ser Gly Cys Ser Leu Lys
 370 375 380

att ttt aac aac caa gaa ttt gct cag tta ttg gca cag tct gtg aac 1623
 Ile Phe Asn Asn Gln Glu Phe Ala Gln Leu Leu Ala Gln Ser Val Asn
 385 390 395

cat gga ttt gag aca gtc tat gag ctt aca aaa atg tgt act ata cgt 1671
 His Gly Phe Glu Thr Val Tyr Glu Leu Thr Lys Met Cys Thr Ile Arg
 400 405 410

atg agc ttt gtg aag ggc tgg gga gca gaa tac cac cgc cag gat gtt 1719

Met Ser Phe Val Lys Gly Trp Gly Ala Glu Tyr His Arg Gln Asp Val
 415 420 425

act agc acc ccc tgc tgg att gag ata cat ctg cac ggc ccc ctc cag 1767
 Thr Ser Thr Pro Cys Trp Ile Glu Ile His Leu His Gly Pro Leu Gln
 430 435 440 445

tgg ctg gat aaa gtt ctt act caa atg ggt tca cct cat aat cct att 1815
 Trp Leu Asp Lys Val Leu Thr Gln Met Gly Ser Pro His Asn Pro Ile
 450 455 460

tca tct gta tct taa atggccccag catctgcctc tggaaaacta ttgagccttg 1870
 Ser Ser Val Ser
 465

catgtacttg aaggatggat gagtcagaca cgattgagaa ctgacaaagg agccttgata 1930

atacttgacc tctgtgacca actgttggat tcagaaattt aaacaaaaaa aaaaaaaaaa 1990

<210> 2

<211> 1970

<212> mRNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (283)..(1794)

<400> 2

aggaaacggt ttattaggag ggagtgggtgg agctgggcca ggcaggaaga cgctggaata 60

agaaacattt ttgctccagc ccccatccca gtcccgggag gctgccgcgc cagctgcgcc 120

gagcgagccc ctccccggct ccagcccgggt ccggggccgc gccggacccc agcccgccgt 180

ccagcgctgg cggtgcaact gcggccgcgc ggtggagggg aggtggcccc ggtccgccga 240

aggctagcgc cccgccaccc gcagagcggg ccagaggga cc atg acc ttg ggc 294
 Met Thr Leu Gly

1

tcc ccc agg aaa ggc ctt ctg atg ctg ctg atg gcc ttg gtg acc cag 342
 Ser Pro Arg Lys Gly Leu Leu Met Leu Leu Met Ala Leu Val Thr Gln
 5 10 15 20

gga gac cct gtg aag ccg tct cgg ggc ccg ctg gtg acc tgc acg tgt 390
 Gly Asp Pro Val Lys Pro Ser Arg Gly Pro Leu Val Thr Cys Thr Cys
 25 30 35

gag agc cca cat tgc aag ggg cct acc tgc cgg ggg gcc tgg tgc aca	438
Glu Ser Pro His Cys Lys Gly Pro Thr Cys Arg Gly Ala Trp Cys Thr	
40 45 50	
gta gtg ctg gtg cgg gag gag ggg agg cac ccc cag gaa cat cgg ggc	486
Val Val Leu Val Arg Glu Glu Gly Arg His Pro Gln Glu His Arg Gly	
55 60 65	
tgc ggg aac ttg cac agg gag ctc tgc agg ggg cgc ccc acc gag ttc	534
Cys Gly Asn Leu His Arg Glu Leu Cys Arg Gly Arg Pro Thr Glu Phe	
70 75 80	
gtc aac cac tac tgc tgc gac agc cac ctc tgc aac cac aac gtg tcc	582
Val Asn His Tyr Cys Cys Asp Ser His Leu Cys Asn His Asn Val Ser	
85 90 95 100	
ctg gtg ctg gag gcc acc caa cct cct tgc gag cag ccg gga aca gat	630
Leu Val Leu Glu Ala Thr Gln Pro Pro Ser Glu Gln Pro Gly Thr Asp	
105 110 115	
ggc cag ctg gcc ctg atc ctg ggc ccc gtg ctg gcc ttg ctg gcc ctg	678
Gly Gln Leu Ala Leu Ile Leu Gly Pro Val Leu Ala Leu Leu Ala Leu	
120 125 130	
gtg gcc ctg ggt gtc ctg ggc ctg tgg cat gtc cga cgg agg cag gag	726
Val Ala Leu Gly Val Leu Gly Leu Trp His Val Arg Arg Arg Gln Glu	
135 140 145	
aag cag cgt ggc ctg cac agc gag ctg gga gag tcc agt ctc atc ctg	774
Lys Gln Arg Gly Leu His Ser Glu Leu Gly Glu Ser Ser Leu Ile Leu	
150 155 160	
aaa gca tct gag cag ggc gac acg atg ttg ggg gac ctc ctg gac agt	822
Lys Ala Ser Glu Gln Gly Asp Thr Met Leu Gly Asp Leu Leu Asp Ser	
165 170 175 180	
gac tgc acc aca ggg agt ggc tca ggg ctc ccc ttc ctg gtg cag agg	870
Asp Cys Thr Thr Gly Ser Gly Ser Gly Leu Pro Phe Leu Val Gln Arg	
185 190 195	
aca gtg gca cgg cag gtt gcc ttg gtg gag tgt gtg gga aaa ggc cgc	918
Thr Val Ala Arg Gln Val Ala Leu Val Glu Cys Val Gly Lys Gly Arg	
200 205 210	
tat ggc gaa gtg tgg cgg ggc ttg tgg cac ggt gag agt gtg gcc gtc	966
Tyr Gly Glu Val Trp Arg Gly Leu Trp His Gly Glu Ser Val Ala Val	
215 220 225	
aag atc ttc tcc tcg agg gat gaa cag tcc tgg ttc cgg gag act gag	1014
Lys Ile Phe Ser Ser Arg Asp Glu Gln Ser Trp Phe Arg Glu Thr Glu	

230	235	240	
atc tat aac aca gta ttg ctc aga cac gac aac atc cta ggc ttc atc Ile Tyr Asn Thr Val Leu Leu Arg His Asp Asn Ile Leu Gly Phe Ile 245 250 255 260	1062		
gcc tca gac atg acc tcc cgc aac tcg agc acg cag ctg tgg ctc atc Ala Ser Asp Met Thr Ser Arg Asn Ser Ser Thr Gln Leu Trp Leu Ile 265 270 275	1110		
acg cac tac cac gag cac ggc tcc ctc tac gac ttt ctg cag aga cag Thr His Tyr His Glu His Gly Ser Leu Tyr Asp Phe Leu Gln Arg Gln 280 285 290	1158		
acg ctg gag ccc cat ctg gct ctg agg cta gct gtg tcc gcg gca tgc Thr Leu Glu Pro His Leu Ala Leu Arg Leu Ala Val Ser Ala Ala Cys 295 300 305	1206		
ggc ctg gcg cac ctg cac gtg gag atc ttc ggt aca cag ggc aaa cca Gly Leu Ala His Leu His Val Glu Ile Phe Gly Thr Gln Gly Lys Pro 310 315 320	1254		
gcc att gcc cac cgc gac ttc aag agc cgc aat gtg ctg gtc aag agc Ala Ile Ala His Arg Asp Phe Lys Ser Arg Asn Val Leu Val Lys Ser 325 330 335 340	1302		
aac ctg cag tgt tgc atc gcc gac ctg ggc ctg gct gtg atg cac tca Asn Leu Gln Cys Cys Ile Ala Asp Leu Gly Leu Ala Val Met His Ser 345 350 355	1350		
cag ggc agc gat tac ctg gac atc ggc aac aac ccg aga gtg ggc acc Gln Gly Ser Asp Tyr Leu Asp Ile Gly Asn Asn Pro Arg Val Gly Thr 360 365 370	1398		
aag cgg tac atg gca ccc gag gtg ctg gac gag cag atc cgc acg gac Lys Arg Tyr Met Ala Pro Glu Val Leu Asp Glu Gln Ile Arg Thr Asp 375 380 385	1446		
tgc ttt gag tcc tac aag tgg act gac atc tgg gcc ttt ggc ctg gtg Cys Phe Glu Ser Tyr Lys Trp Thr Asp Ile Trp Ala Phe Gly Leu Val 390 395 400	1494		
ctg tgg gag att gcc cgc cgg acc atc gtg aat ggc atc gtg gag gac Leu Trp Glu Ile Ala Arg Arg Thr Ile Val Asn Gly Ile Val Glu Asp 405 410 415 420	1542		
tat aga cca ccc ttc tat gat gtg gtg ccc aat gac ccc agc ttt gag Tyr Arg Pro Pro Phe Tyr Asp Val Val Pro Asn Asp Pro Ser Phe Glu 425 430 435	1590		

gac atg aag aag gtg gtg tgt gtg gat cag cag acc ccc acc atc cct 1638
 Asp Met Lys Lys Val Val Cys Val Asp Gln Gln Thr Pro Thr Ile Pro
 440 445 450

aac cgg ctg gct gca gac ccg gtc ctc tca ggc cta gct cag atg atg 1686
 Asn Arg Leu Ala Ala Asp Pro Val Leu Ser Gly Leu Ala Gln Met Met
 455 460 465

cgg gag tgc tgg tac cca aac ccc tct gcc cga ctc acc gcg ctg cgg 1734
 Arg Glu Cys Trp Tyr Pro Asn Pro Ser Ala Arg Leu Thr Ala Leu Arg
 470 475 480

atc aag aag aca cta caa aaa att agc aac agt cca gag aag cct aaa 1782
 Ile Lys Lys Thr Leu Gln Lys Ile Ser Asn Ser Pro Glu Lys Pro Lys
 485 490 495 500

gtg att caa tag cccaggagca cctgattcct ttctgcctgc agggggctgg 1834
 Val Ile Gln

gggggtgggg ggcagtggat ggtgccctat ctgggtagag gtagtgtgag tgtggtgtgt 1894

gctggggatg ggcagctgcg cctgcctgct cggccccag cccaccagc caaaaataca 1954

gctgggctga aacctg 1970

<210> 3

<211> 1547

<212> mRNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (324)..(1514)

<400> 3

ggggacttct tgaacttgca gggagaataa cttgcgcacc ccactttgcg ccggtgcctt 60

tgccccagcg gagcctgctt cgccatctcc gagccccacc gccctccac tcctcggcct 120

tgcccgacac tgagacgctg ttcccagcgt gaaaagagag actgcgcggc cggcacccgg 180

gagaaggagg aggcaaagaa aaggaacgga cattcgggtcc ttgcgccagg tcctttgacc 240

agagtttttc catgtggacg ctctttcaat ggacgtgtcc ccgcgtgctt cttagacgga 300

ctgcggtctc ctaaaggctcg acc atg gtg gcc ggg acc cgc tgt ctt cta gcg 353

Met Val Ala Gly Thr Arg Cys Leu Leu Ala

1

5

10

ttg ctg ctt ccc cag gtc ctc ctg ggc ggc gcg gct ggc ctc gtt ccg	401
Leu Leu Leu Pro Gln Val Leu Leu Gly Gly Ala Ala Gly Leu Val Pro	
15 20 25	
gag ctg ggc cgc agg aag ttc gcg gcg gcg tcg tcg ggc cgc ccc tca	449
Glu Leu Gly Arg Arg Lys Phe Ala Ala Ala Ser Ser Gly Arg Pro Ser	
30 35 40	
tcc cag ccc tct gac gag gtc ctg agc gag ttc gag ttg cgg ctg ctc	497
Ser Gln Pro Ser Asp Glu Val Leu Ser Glu Phe Glu Leu Arg Leu Leu	
45 50 55	
agc atg ttc ggc ctg aaa cag aga ccc acc ccc agc agg gac gcc gtg	545
Ser Met Phe Gly Leu Lys Gln Arg Pro Thr Pro Ser Arg Asp Ala Val	
60 65 70	
gtg ccc ccc tac atg cta gac ctg tat cgc agg cac tca ggt cag ccg	593
Val Pro Pro Tyr Met Leu Asp Leu Tyr Arg Arg His Ser Gly Gln Pro	
75 80 85 90	
ggc tca ccc gcc cca gac cac cgg ttg gag agg gca gcc agc cga gcc	641
Gly Ser Pro Ala Pro Asp His Arg Leu Glu Arg Ala Ala Ser Arg Ala	
95 100 105	
aac act gtg cgc agc ttc cac cat gaa gaa tct ttg gaa gaa cta cca	689
Asn Thr Val Arg Ser Phe His His Glu Glu Ser Leu Glu Glu Leu Pro	
110 115 120	
gaa acg agt ggg aaa aca acc cgg aga ttc ttc ttt aat tta agt tct	737
Glu Thr Ser Gly Lys Thr Thr Arg Arg Phe Phe Phe Asn Leu Ser Ser	
125 130 135	
atc ccc acg gag gag ttt atc acc tca gca gag ctt cag gtt ttc cga	785
Ile Pro Thr Glu Glu Phe Ile Thr Ser Ala Glu Leu Gln Val Phe Arg	
140 145 150	
gaa cag atg caa gat gct tta gga aac aat agc agt ttc cat cac cga	833
Glu Gln Met Gln Asp Ala Leu Gly Asn Asn Ser Ser Phe His His Arg	
155 160 165 170	
att aat att tat gaa atc ata aaa cct gca aca gcc aac tcg aaa ttc	881
Ile Asn Ile Tyr Glu Ile Ile Lys Pro Ala Thr Ala Asn Ser Lys Phe	
175 180 185	
ccc gtg acc aga ctt ttg gac acc agg ttg gtg aat cag aat gca agc	929
Pro Val Thr Arg Leu Leu Asp Thr Arg Leu Val Asn Gln Asn Ala Ser	
190 195 200	
agg tgg gaa agt ttt gat gtc acc ccc gct gtg atg cgg tgg act gca	977
Arg Trp Glu Ser Phe Asp Val Thr Pro Ala Val Met Arg Trp Thr Ala	

205	210	215	
cag gga cac gcc aac cat gga ttc gtg gtg gaa gtg gcc cac ttg gag Gln Gly His Ala Asn His Gly Phe Val Val Glu Val Ala His Leu Glu 220 225 230			1025
gag aaa caa ggt gtc tcc aag aga cat gtt agg ata agc agg tct ttg Glu Lys Gln Gly Val Ser Lys Arg His Val Arg Ile Ser Arg Ser Leu 235 240 245 250			1073
cac caa gat gaa cac agc tgg tca cag ata agg cca ttg cta gta act His Gln Asp Glu His Ser Trp Ser Gln Ile Arg Pro Leu Leu Val Thr 255 260 265			1121
ttt ggc cat gat gga aaa ggg cat cct ctc cac aaa aga gaa aaa cgt Phe Gly His Asp Gly Lys Gly His Pro Leu His Lys Arg Glu Lys Arg 270 275 280			1169
caa gcc aaa cac aaa cag cgg aaa cgc ctt aag tcc agc tgt aag aga Gln Ala Lys His Lys Gln Arg Lys Arg Leu Lys Ser Ser Cys Lys Arg 285 290 295			1217
cac cct ttg tac gtg gac ttc agt gac gtg ggg tgg aat gac tgg att His Pro Leu Tyr Val Asp Phe Ser Asp Val Gly Trp Asn Asp Trp Ile 300 305 310			1265
gtg gct ccc ccg ggg tat cac gcc ttt tac tgc cac gga gaa tgc cct Val Ala Pro Pro Gly Tyr His Ala Phe Tyr Cys His Gly Glu Cys Pro 315 320 325 330			1313
ttt cct ctg gct gat cat ctg aac tcc act aat cat gcc att gtt cag Phe Pro Leu Ala Asp His Leu Asn Ser Thr Asn His Ala Ile Val Gln 335 340 345			1361
acg ttg gtc aac tct gtt aac tct aag att cct aag gca tgc tgt gtc Thr Leu Val Asn Ser Val Asn Ser Lys Ile Pro Lys Ala Cys Cys Val 350 355 360			1409
ccg aca gaa ctc agt gct atc tcg atg ctg tac ctt gac gag aat gaa Pro Thr Glu Leu Ser Ala Ile Ser Met Leu Tyr Leu Asp Glu Asn Glu 365 370 375			1457
aag gtt gta tta aag aac tat cag gac atg gtt gtg gag ggt tgt ggg Lys Val Val Leu Lys Asn Tyr Gln Asp Met Val Val Glu Gly Cys Gly 380 385 390			1505
tgt cgc tag tacagcaaaa ttaaatacat aaatatatat ata Cys Arg 395			1547

<210> 4

<211> 1999

<212> mRNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (478)..(1704)

<400> 4

gagggagggg ccgccgggga agaggaggag gaaggaaaga aagaaagcga gggagggaaa 60

gaggaggaag gaagatgcga gaaggcagag gaggaggag ggagggaagg agcgcgagc 120

ccggcccga agctaggtga gtgtggcatc cgagctgagg gacgcgagcc tgagacgcc 180

ctgtgtctcc ggctgagtat ctagcttgct tccccgatgg gattcccgtc caagctatct 240

cgagcctgca gcgccacagt ccccggccct cgcccagggt cactgcaacc gttcagaggt 300

ccccaggagc tgctgctggc gagcccgcta ctgcaggac ctatggagcc attccgtagt 360

gccatcccga gcaacgcact gctgcagctt ccctgagcct ttccagcaag tttgttcaag 420

attggctgtc aagaatcatg gactgttatt atatgccttg ttttctgtca agacacc 477

atg att cct ggt aac cga atg ctg atg gtc gtt tta tta tgc caa gtc 525

Met Ile Pro Gly Asn Arg Met Leu Met Val Val Leu Leu Cys Gln Val

1

5

10

15

ctg cta gga ggc gcg agc cat gct agt ttg ata cct gag acg ggg aag 573

Leu Leu Gly Gly Ala Ser His Ala Ser Leu Ile Pro Glu Thr Gly Lys

20

25

30

aaa aaa gtc gcc gag att cag ggc cac gcg gga gga cgc cgc tca ggg 621

Lys Lys Val Ala Glu Ile Gln Gly His Ala Gly Gly Arg Arg Ser Gly

35

40

45

cag agc cat gag ctc ctg cgg gac ttc gag gcg aca ctt ctg cag atg 669

Gln Ser His Glu Leu Leu Arg Asp Phe Glu Ala Thr Leu Leu Gln Met

50

55

60

ttt ggg ctg cgc cgc cgc ccg cag cct agc aag agt gcc gtc att ccg 717

Phe Gly Leu Arg Arg Arg Pro Gln Pro Ser Lys Ser Ala Val Ile Pro

65

70

75

80

gac tac atg cgg gat ctt tac cgg ctt cag tct ggg gag gag gag gaa 765

Asp Tyr Met Arg Asp Leu Tyr Arg Leu Gln Ser Gly Glu Glu Glu Glu

85

90

95

gag cag atc cac agc act ggt ctt gag tat cct gag cgc ccg gcc agc 813
 Glu Gln Ile His Ser Thr Gly Leu Glu Tyr Pro Glu Arg Pro Ala Ser
 100 105 110

cgg gcc aac acc gtg agg agc ttc cac cac gaa gaa cat ctg gag aac 861
 Arg Ala Asn Thr Val Arg Ser Phe His His Glu Glu His Leu Glu Asn
 115 120 125

atc cca ggg acc agt gaa aac tct gct ttt cgt ttc ctc ttt aac ctc 909
 Ile Pro Gly Thr Ser Glu Asn Ser Ala Phe Arg Phe Leu Phe Asn Leu
 130 135 140

agc agc atc cct gag aac gag gcg atc tcc tct gca gag ctt cgg ctc 957
 Ser Ser Ile Pro Glu Asn Glu Ala Ile Ser Ser Ala Glu Leu Arg Leu
 145 150 155 160

ttc cgg gag cag gtg gac cag ggc cct gat tgg gaa agg ggc ttc cac 1005
 Phe Arg Glu Gln Val Asp Gln Gly Pro Asp Trp Glu Arg Gly Phe His
 165 170 175

cgt ata aac att tat gag gtt atg aag ccc cca gca gaa gtg gtg cct 1053
 Arg Ile Asn Ile Tyr Glu Val Met Lys Pro Pro Ala Glu Val Val Pro
 180 185 190

ggg cac ctc atc aca cga cta ctg gac acg aga ctg gtc cac cac aat 1101
 Gly His Leu Ile Thr Arg Leu Leu Asp Thr Arg Leu Val His His Asn
 195 200 205

gtg aca cgg tgg gaa act ttt gat gtg agc cct gcg gtc ctt cgc tgg 1149
 Val Thr Arg Trp Glu Thr Phe Asp Val Ser Pro Ala Val Leu Arg Trp
 210 215 220

acc cgg gag aag cag cca aac tat ggg cta gcc att gag gtg act cac 1197
 Thr Arg Glu Lys Gln Pro Asn Tyr Gly Leu Ala Ile Glu Val Thr His
 225 230 235 240

ctc cat cag act cgg acc cac cag ggc cag cat gtc agg att agc cga 1245
 Leu His Gln Thr Arg Thr His Gln Gly Gln His Val Arg Ile Ser Arg
 245 250 255

tcg tta cct caa ggg agt ggg aat tgg gcc cag ctc cgg ccc ctc ctg 1293
 Ser Leu Pro Gln Gly Ser Gly Asn Trp Ala Gln Leu Arg Pro Leu Leu
 260 265 270

gtc acc ttt ggc cat gat ggc cgg ggc cat gcc ttg acc cga cgc cgg 1341
 Val Thr Phe Gly His Asp Gly Arg Gly His Ala Leu Thr Arg Arg Arg
 275 280 285

agg gcc aag cgt agc cct aag cat cac tca cag cgg gcc agg aag aag 1389

Arg Ala Lys Arg Ser Pro Lys His His Ser Gln Arg Ala Arg Lys Lys
 290 295 300
 aat aag aac tgc cgg cgc cac tcg ctc tat gtg gac ttc agc gat gtg 1437
 Asn Lys Asn Cys Arg Arg His Ser Leu Tyr Val Asp Phe Ser Asp Val
 305 310 315 320
 ggc tgg aat gac tgg att gtg gcc cca cca ggc tac cag gcc ttc tac 1485
 Gly Trp Asn Asp Trp Ile Val Ala Pro Pro Gly Tyr Gln Ala Phe Tyr
 325 330 335
 tgc cat ggg gac tgc ccc ttt cca ctg gct gac cac ctc aac tca acc 1533
 Cys His Gly Asp Cys Pro Phe Pro Leu Ala Asp His Leu Asn Ser Thr
 340 345 350
 aac cat gcc att gtg cag acc ctg gtc aat tct gtc aat tcc agt atc 1581
 Asn His Ala Ile Val Gln Thr Leu Val Asn Ser Val Asn Ser Ser Ile
 355 360 365
 ccc aaa gcc tgt tgt gtg ccc act gaa ctg agt gcc atc tcc atg ctg 1629
 Pro Lys Ala Cys Cys Val Pro Thr Glu Leu Ser Ala Ile Ser Met Leu
 370 375 380
 tac ctg gat gag tat gat aag gtg gta ctg aaa aat tat cag gag atg 1677
 Tyr Leu Asp Glu Tyr Asp Lys Val Val Leu Lys Asn Tyr Gln Glu Met
 385 390 395 400
 gta gta gag gga tgt ggg tgc cgc tga gatcaggcag tccttgagga 1724
 Val Val Glu Gly Cys Gly Cys Arg
 405
 tagacagata tacacaccac acacacacac cacatacacc acacacacac gttcccatcc 1784
 actcaccacac acactacaca gactgcttcc ttatagctgg actttttatit aaaaaaaaaa 1844
 aaaaaaaaaat ggaaaaaatc cctaaacatt caccttgacc ttatttatga ctttacgtgc 1904
 aaatgttttg accatattga tcatatattt tgacaaaata tattttataac tacgtattaa 1964
 aagaaaaaaa taaatgagt cattatttta aaggt 1999

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 5
actaccacca cggctttcac

20

<210> 6
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 6
aataggattg tggggtgagc

20

<210> 7
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 7
ccgtcaagat cttctcctcg

20

<210> 8
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 8
tcatgtctga ggcgatgaag

20

<210> 9
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 9
cccagcgtga aaagagagac

20

<210> 10
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 10
gagaccgcag tccgtctaag 20

<210> 11
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 11
tgagcctttc cagcaagttt 20

<210> 12
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 12
cttccccgtc tcaggtatca 20

<210> 13
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 13
caagctgggtc acattcatag cggct 25

<210> 14
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Mus musculus

<400> 14
 ttcctcccct tggaggagcg ccgcccg

27

<210> 15
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 15
 ggagctcccc aatttgttg

19

<210> 16
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 16
 cagcctccgc ctcttacc

18

<210> 17
 <211> 262
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 17
 cccaccaccg tctgcaagat cccagcgagg tgcagcttga aaatcttcaa caaccaagag 60
 tttgctcagc tactggcgca gtctgtgaac cacgggttcg agaccgtgta tgaactcacc 120
 aaaatgtgca ctattcggat gagcttcgtg aagggttggg gagccgaata ccaccggcag 180
 gatgttacca gcaccccctg ctggattgag atccatctgc atggccctct ccagtggctg 240
 gataaggttc tgaccagat gg 262

<210> 18

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

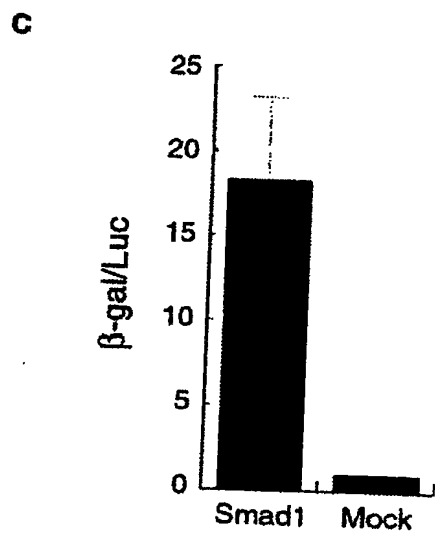
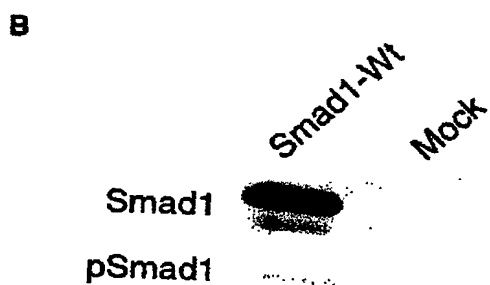
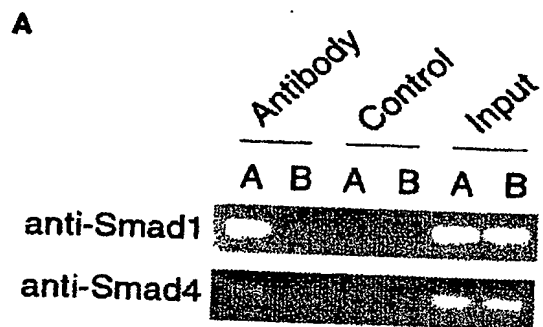
<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 18

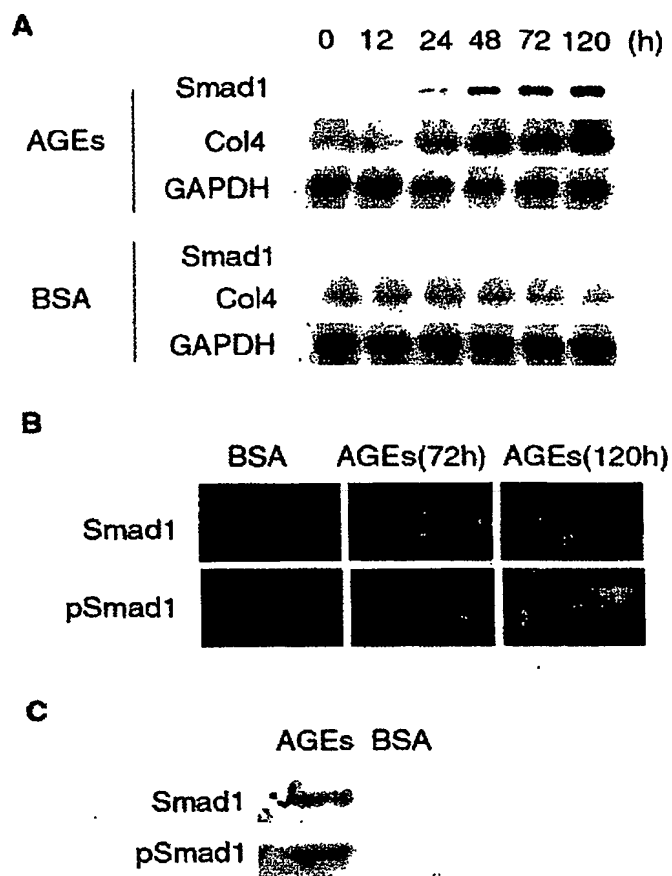
catgctcgtc acattcaaag ccgct

25

【書類名】 図面
【図 1】

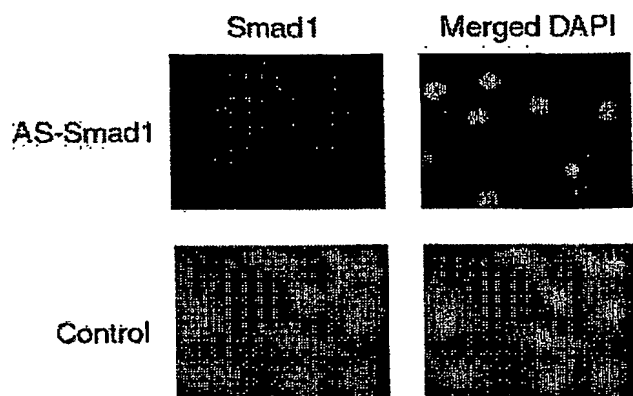


【図 2】

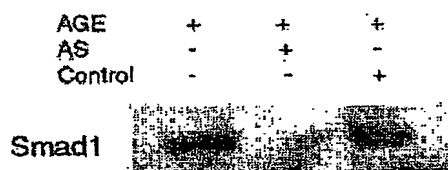


【図 3】

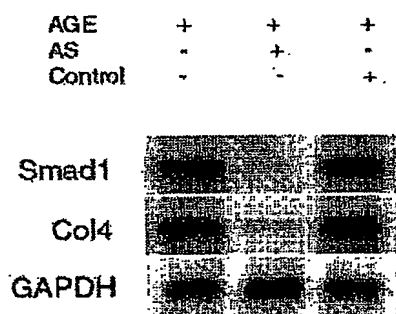
A



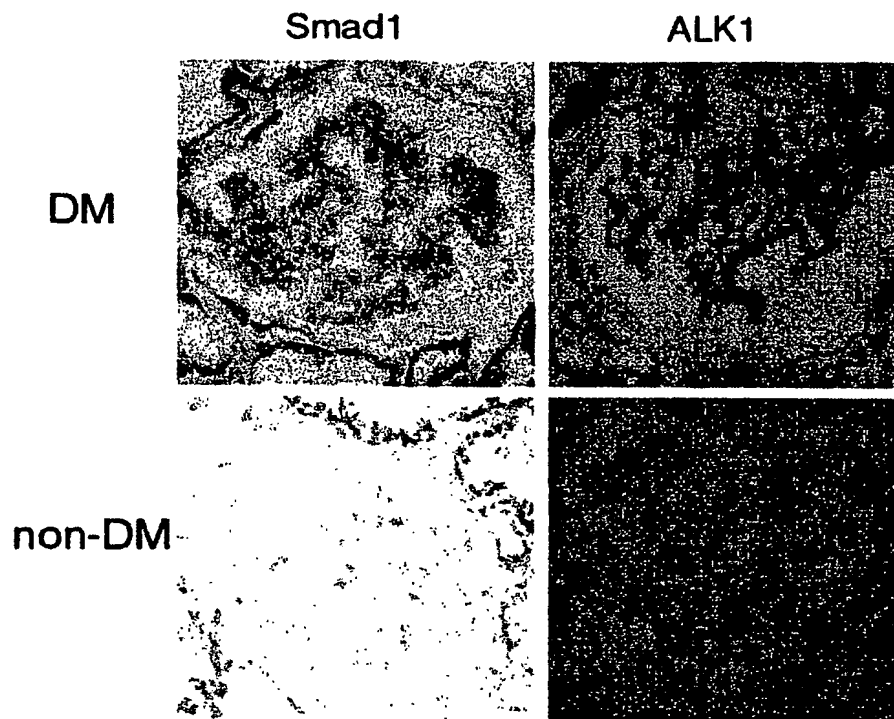
B



C



【図 4】



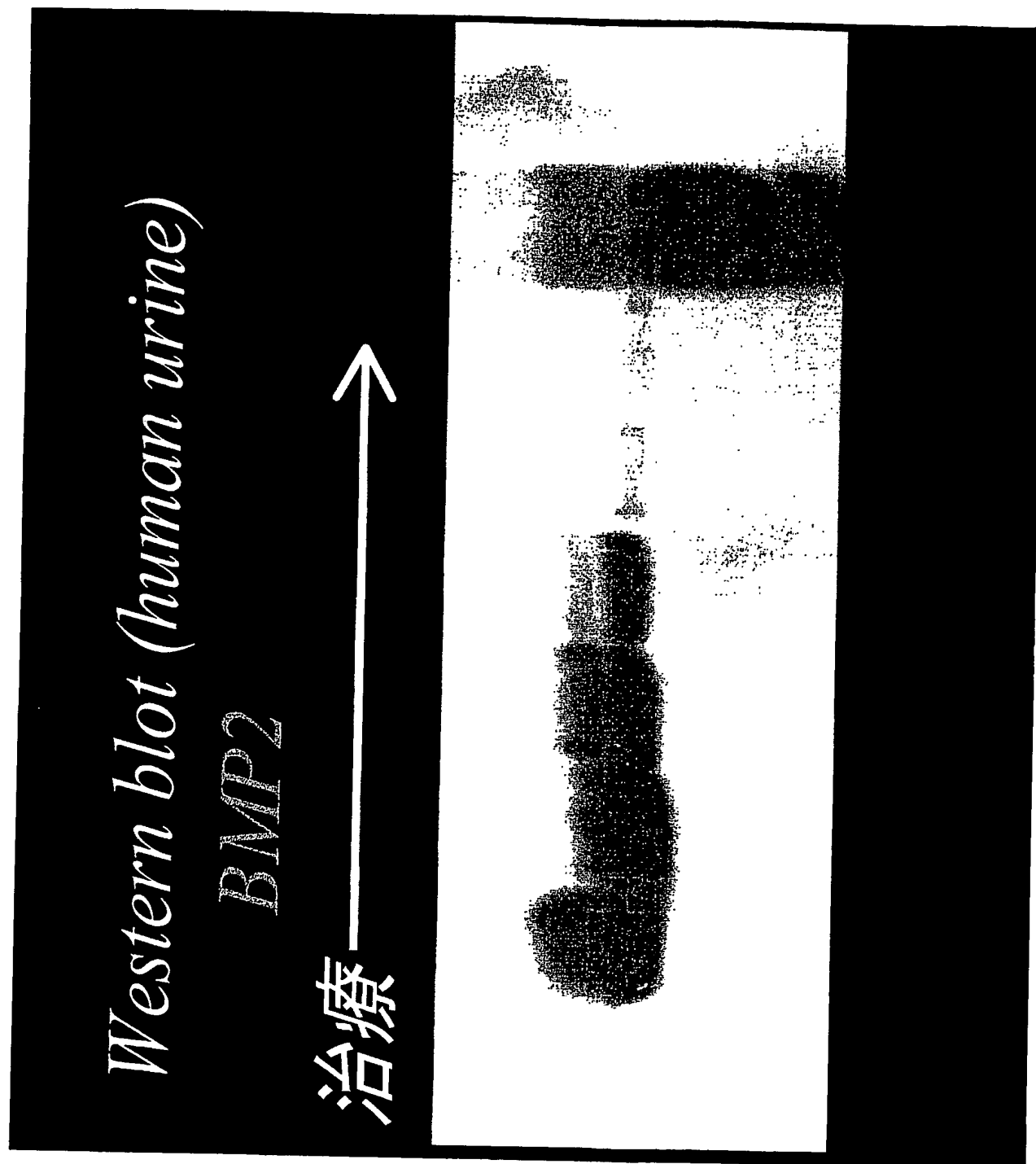
【図 5】

*Array analysis (AGEs stimulation
on mMC)*

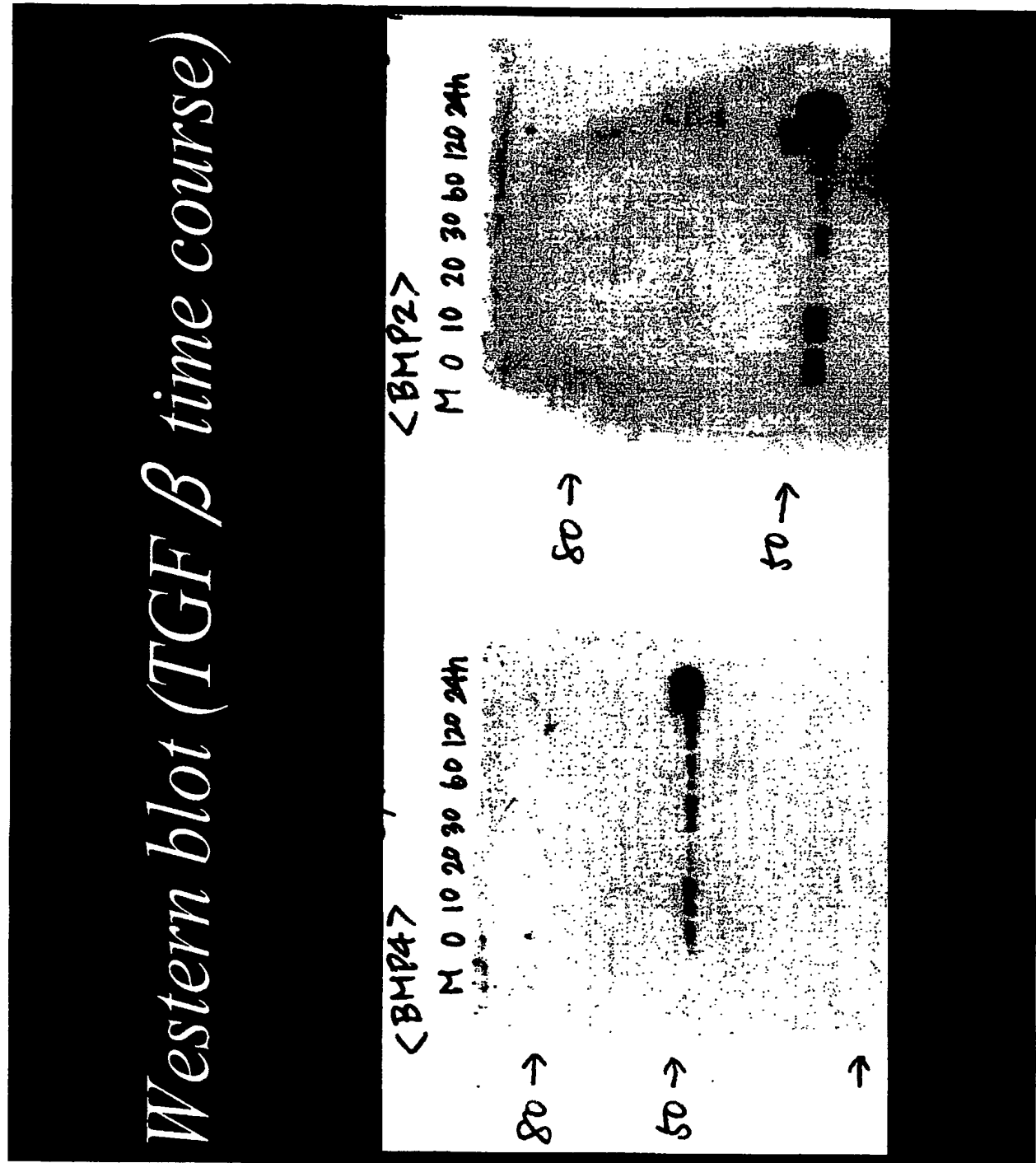
AGE/BSA 比 AGE/BSA(color swap)

<i>BMP4</i>	21.25	2.32
<i>BMP1</i>	2.06	2.07
<i>SMAD1</i>	1.27	1.22
<i>RAGE</i>	1.15	5.6
<i>TGFbRII</i>	0.49	12.1
<i>TGFbRI</i>	1.15	1.1
<i>ALK3</i>	1.18	1.3
<i>BMPRII</i>	2.06	4.74

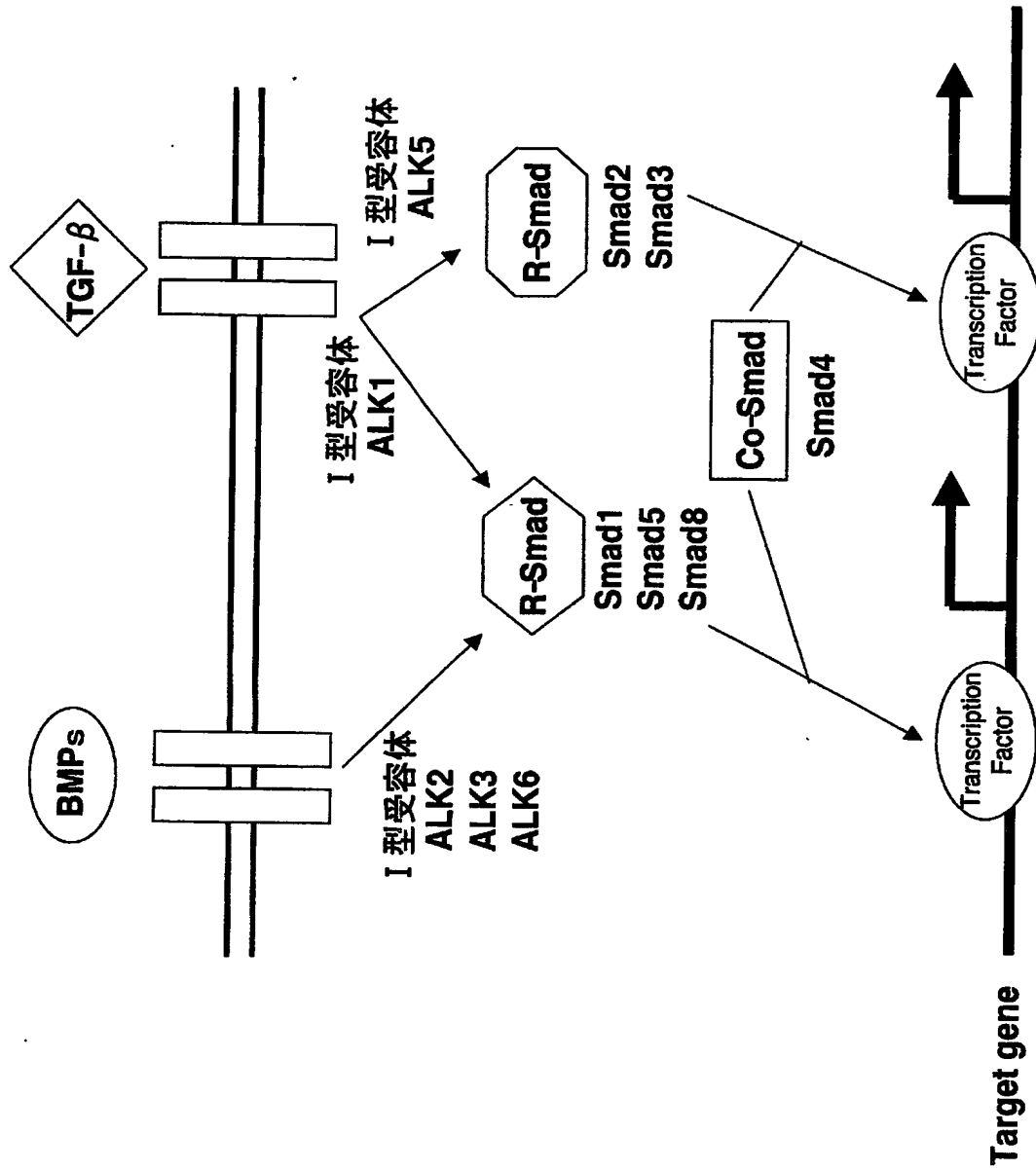
【図 6】



【図 7】



【図 8】



【書類名】要約書

【要約】

【課題】 IV型コラーゲンの過剰産生に直接関わっている物質を同定し、その物質が糖尿病性腎症の病因として決定的な役割を持つことを示すこと。また、その物質を利用した糖尿病性腎症の検出方法及びキットを提供すること。さらに、IV型コラーゲンの過剰産生に直接関わっている物質の発現を抑制する作用を有する物質の用途を提供すること。さらにまた、糖尿病性腎症の予防及び／又は治療に有効な物質を同定する方法及びキットなどを提供すること。

【解決手段】 生体試料におけるSmad1及び／又はSmad1活性化作用を有する物質の発現を測定することを含む、糖尿病性腎症の検出方法。Smad1及び／又はSmad1活性化作用を有する物質の発現を測定するための試薬を含む、糖尿病性腎症を検出するためのキット。Smad1の発現を抑制する作用を有する物質を有効成分として含む、糖尿病性腎症の予防及び／又は治療剤。Smad1の発現を抑制する作用を有する物質を有効成分として含む、細胞外マトリックスの増殖を阻害する薬剤。Smad1の発現を抑制する作用を有する物質を有効成分として含む、 $\alpha 1$ IV型コラーゲンの発現を抑制する薬剤。被験物質がSmad1の発現を抑制するか否かを判定することを含む、糖尿病性腎症の予防及び／又は治療に有効な物質を同定する方法など。Smad1の発現を測定するための試薬を含む、糖尿病性腎症の予防及び／又は治療に有効な物質を同定するためのキットなど。

【選択図】 なし

特願 2003-319538

ページ： 1

出願人履歴情報

識別番号

[501124337]

1. 変更年月日
[変更理由]

2001年 3月27日

新規登録

住所
氏名

東京都千代田区隼町2-19

ヒュービット ジェノミクス株式会社

特願 2003-319538

ページ： 2/E

出願人履歴情報

識別番号

[599063284]

1. 変更年月日

1999年 5月10日

[変更理由]

新規登録

住 所

京都府京都市上京区油小路通元誓願寺下ル東入戒光寺町495
-1-102

氏 名

土井 俊夫

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☒ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.